

**Universidade de Lisboa**  
Faculdade de Medicina de Lisboa



***LOCUS CERULEUS HUMANO:  
MAPEAMENTO DOS NEURORECEPTORES  
DOPAMINÉRGICOS D1 E D2***



Joana Adelaide Mota de Oliveira de Barbas Regala

Dissertação de Mestrado em Neurociências

2013

**Universidade de Lisboa**  
Faculdade de Medicina de Lisboa



***LOCUS CERULEUS HUMANO:  
MAPEAMENTO DOS NEURORECEPTORES  
DOPAMINÉRGICOS D1 E D2***

Joana Adelaide Mota de Oliveira de Barbas Regala

Dissertação de Mestrado orientada pelo Professor Doutor Gonçalves Ferreira

Mestrado em Neurociências

2013

A impressão desta dissertação foi aprovada em reunião do conselho científico dia 19 de Novembro de 2013

## RESUMO

**Fundamentos:** O *Locus Ceruleus* (LC) humano é um núcleo situado na porção dorsal superior da protuberância, envolvido em múltiplos circuitos neuroquímicos. As suas aferências dopaminérgicas são fundamentais para o estado de vigília e são provenientes sobretudo da área tegmental ventral (via mesocérbica) e da substância cinzenta periaquedutal. Num estudo anterior, concluímos que o LC humano é um núcleo mais estreito ( $\pm 1,3$  mm) e mais longo ( $\pm 14$ mm) do que previamente descrito.

**Objetivos:** Estudo da distribuição diferencial dos subtipos de receptores dopaminérgicos D1 e D2 (D1R e D2R) ao longo da extensão do LC humano e a nível intracelular.

**Material e Métodos:** 8 LC obtidos de 4 troncos cerebrais (TC) humanos. Fixação, dissecação e inclusão em parafina dos TC; execução de cortes seriados e referenciados no micrótomo perpendicularmente ao pavimento do IV ventrículo e à linha média; marcação imunohistoquímica dos subtipos D1R e D2R e coloração com hematoxilina como controlo histológico; observação da marcação dos neurónios do LC ao microscópio de fluorescência; análise da distribuição de D1R e D2R ao longo de toda a extensão do LC e a nível intracelular e da sua co-localização celular; estudo da proporção relativa de D1R e D2R através da análise quantitativa da respetiva imunoreactividade, através de programa informático adequado (Image J 1.44®); análise estatística dos dados pelo teste de Wilcoxon ( $\alpha < 0,05$ ).

**Resultados e Conclusões:** Os D2R são significativamente mais abundantes que os D1R no LC humano ( $p \leq 0,004$ ). Os D2R estão presentes na generalidade dos neurónios, encontrando-se em amplos compartimentos citoplasmáticos, incluindo a nível dos grânulos de neuromelanina, bem como na porção proximal das dendrites e membrana citoplasmática. Os D1R têm uma distribuição mais escassa e esparsa, sobretudo no terço superior do LC, expressando-se em neurónios pobres em grânulos de neuromelanina, em compartimentos intracitoplasmáticos mais restritos. A co-localização de ambos os neuroreceptores é pouco frequente.

---

**Palavras-Chave:** Locus Ceruleus, neuromelanina, receptores dopaminérgicos, tronco cerebral, humanos.

## ABSTRACT

**Background:** Locus coeruleus (LC) is a brainstem (BS) nucleus located in the upper dorsal pons, involved in several neurochemical circuits. Its dopaminergic afferents from ventral tegmental area (via mesocoerulear) and periaqueductal gray matter play a key role in promotion of arousal. In a previous study, it was concluded that the human LC is narrower ( $\pm 1.3$  mm) and longer nucleus ( $\pm 14$ mm) than previously described.

**Objectives:** To study the differential distribution of D1 and D2 dopaminergic receptors subtypes (D1R and D2R) along the human LC length and at subcellular level.

**Material and Methods:** 8 LC obtained from 4 human BS. Fixation, dissection and paraffin embedding of BS; serial sections on the microtome perpendicular to the fourth ventricle floor and the midline planes; immunohistochemical labeling of D1R and D2R subtypes and staining with hematoxylin for histological control; observation on fluorescence microscope; analysis of differential D1R/D2R distribution along the entire length of the LC and at subcellular level; analysis of cellular co-localization; study of the relative proportion of each subtype receptor by quantitative analysis of the respective immunoreactivity through a computer program (Image J ® 1.44); statistical analysis of data by the Wilcoxon test ( $\alpha < .05$ ).

**Results and Conclusions:** D2R are significantly more abundant than D1R in the human LC ( $p \leq 0.004$ ). D2R are globally present in all neurons in large cytoplasmatic compartments, namely at neuromelanin granules as well as in the proximal dendrites and cytoplasmatic membrane. D1R have a sparser and scarcer distribution, mainly in the upper third of the LC, in neurons poor in neuromelanin granules, in more restricted intracytoplasmatic compartments than D2R. The co-localization of both neuroreceptors was seldom seen.

---

**Key-words:** Locus Ceruleus, neuromelanin, dopaminergic receptors, brainstem, humans.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APOVL** – Área pré-óptica ventrolateral

**ATV** - Área tegmental ventral

**AVC** – Acidente vascular cerebral

**LC** - Locus Ceruleus

**D1R** – Receptores dopaminérgicos do subtipo D1

**D2R** - Receptores dopaminérgicos do subtipo D1

**FLC** - Fator libertador de corticotrofina

**GABA** – “Gamma-aminobutyric acid”

**GABA-A** - (receptores) Gabaérgicos do subtipo A

**5-HT1A** – (receptores) Serotoninérgicos do subtipo 1A

**5-HT2C** – (receptores) Serotoninérgicos do subtipo 2C

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 $\beta$

**mRNA** – “Messenger ribonucleic acid”

**NDR** - Núcleo dorsal da rafe

**NPP** - Núcleo pedúnculo-pôntico

**NPrH** – Núcleo prepósito do nervo hipoglosso

**NTDL** - Núcleo tegmentar dorso-lateral

**NTM** - Núcleo tuberomamilar

**NMDA** – “N-methyl-D-aspartate”

**OXR1** – Receptor de orexina do subtipo 1

**OXR1** - Receptor de orexina do subtipo 2

**REM** – “Rapid eye movement”

**RMf** - Ressonância magnética funcional

**TC** – Tronco cerebral

**TSE** – “Turbo Spin-Echo”

Nota: As palavras entre aspas pretendem identificar termos com denominação anglo-saxónica.

# ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
1.1.Importância Funcional e Clínica do LC .....	3
1.1.1.Ciclo Sono-Vigília .....	3
1.1.2.Tônus Muscular .....	5
1.1.3.Ansiedade, Pânico, Memória e Cognição .....	5
1.1.4.Nocicepção .....	6
1.1.5.Funções Autonómicas, Hipotalâmicas, Neuroendócrinas e Reflexas .....	6
1.1.6.Síndrome de Abstinência aos Opiáceos .....	8
1.1.7.Epileptogénese .....	8
1.1.8.Doenças do Desenvolvimento .....	8
1.1.9.Doenças Neurodegenerativas .....	8
1.2 Anatomia Estereotática do LC Humano .....	10
1.3 Caracterização Neuroquímica do LC .....	15
1.3.1 Aferências e Neuroreceptores do LC .....	15
1.3.2 Receptores Dopaminérgicos do LC .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
3.1 Material .....	17
3.2 Métodos .....	18
3.2.1 Recolha e processamento das peças anatómicas .....	18
3.2.2 Processamento anatómico e histoquímico .....	18
3.2.3 Análise qualitativa da localização imunohistoquímica diferencial de D1R e D2R .....	20
3.2.4 Análise semiquantitativa de D1R e D2R.....	20
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
4.1 Especificidade dos anticorpos anti D1R e D2R .....	21
4.2 Localização imunohistoquímica dos receptores dopaminérgicos (D1R e D2R) .....	22
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>31</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O LC é um núcleo da formação reticular do tronco cerebral humano e é o principal núcleo noradrenérgico do sistema nervoso central [16]. Foi descoberto em 1786 pelo anatomista francês *Félix Vicq-d'Azyr*. O seu nome deriva do latim *locus coeruleus*, que significa “mancha azul”, dada a sua coloração azul acinzentada à vista macroscópica do TC. Esta pigmentação deve-se à presença de grânulos de melanina no interior do citoplasma das células do LC [54,80]. Assim, os neurónios do LC humano são facilmente identificáveis em microscopia óptica nos cortes histológicos corados com hematoxilina, visto tratarem-se de neurónios de tamanho médio, com grânulos de neuromelanina no citoplasma (fig.1).



**Figura 1** – Imagem de corte histológico corado com hematoxilina, onde se observa um aglomerado de neurónios pigmentados junto ao sulco limitante do triângulo protuberancial do pavimento do IV ventrículo, correspondente ao LC.

A maior parte do conhecimento atual acerca da morfologia, localização precisa e circuitos funcionais em que o LC está envolvido, deriva de extrapolações de dados experimentais obtidos em modelos animais, existindo poucos estudos efetuados em material humano [3, 4, 15, 18, 32, 36, 37, 38, 40, 44, 47, 51, 56, 71, 74, 75, 76].

### 1.1 Importância Funcional e Clínica do LC

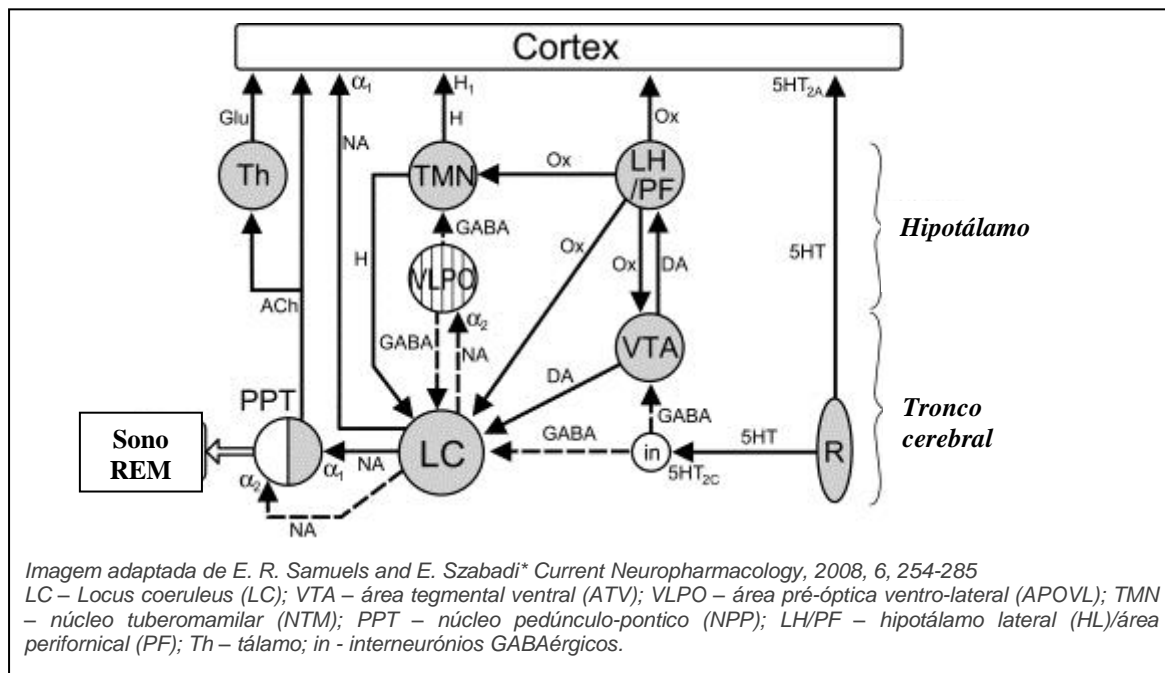
#### 1.1.1 Ciclo Sono-Vigília

O LC é um dos principais núcleos responsável pelo estado de vigília [2, 3, 23, 62], através de projeções excitatórias para diversas áreas corticais do cérebro e de múltiplas conexões com outros núcleos moduladores da rede neuronal de regulação do ciclo sono/vigília (fig.2). O seu nível de atividade correlaciona-se estreitamente com o grau de vigília.

As projeções noradrenérgicas do LC exercem uma ação excitatória sobre outros núcleos promotores do estado de vigília, tais como o NPP [6], o NTDL e neurónios serotoninérgicos do NDR a nível do tronco cerebral [36], núcleos intralaminares do tálamo e neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal [7, 20]. Estas projecções têm também um efeito inibitório sobre neurónios GABAérgicos promotores do sono a nível do prosencéfalo basal e da APOVL do hipotálamo [68]. O LC exerce um efeito inibitório sobre o sono REM provavelmente através da inibição de um subgrupo de neurónios do NPP (fig.2). Este efeito supressor do LC sobre o sono REM está bem documentado por electroencefalogramas em humanos [33]. Estudos em roedores demonstram que as aferências orexinérgicas provenientes do hipotálamo lateral são



fundamentais neste efeito supressor do sono REM (sobretudo a hipocretina 1) [10], promovendo a vigília, bem como têm um efeito facilitador do tônus muscular dos membros inferiores (hipocretina 1 e 2) [37]. Deficiências no sistema orexinérgico têm sido associadas a perturbações do sono, tais como a narcolepsia [65]. Existem também aferências dopaminérgicas facilitadoras do estado de vigília provenientes da ATV [18, 46] (via mesocerúlica) e da substância cinzenta periaquedutal [43]. Os neurónios histaminérgicos do NTM do hipotálamo projetam-se para o LC, actuando sobre receptores de histamina H3, inibindo a libertação de noradrenalina [40]. Ao contrário de outros núcleos hipotalâmicos o LC não se projecta reciprocamente para o NTM. Os neurónios do NTM estão activos no estado de alerta e quiescentes durante o sono, estando sob a influência das aferências GABAérgicas provenientes da APOVL [40]. Assim a ação inibitória das projeções do NTM para o LC restringe a atividade dos seus neurónios durante o estado de vigília. Durante o sono REM, o LC recebe aferências inibitórias dos neurónios GABAérgicos da APOVL do hipotálamo [53, 72] e do núcleo PrH [74].



**Figura 2** – Rede neuronal reguladora do ciclo sono/vigília.

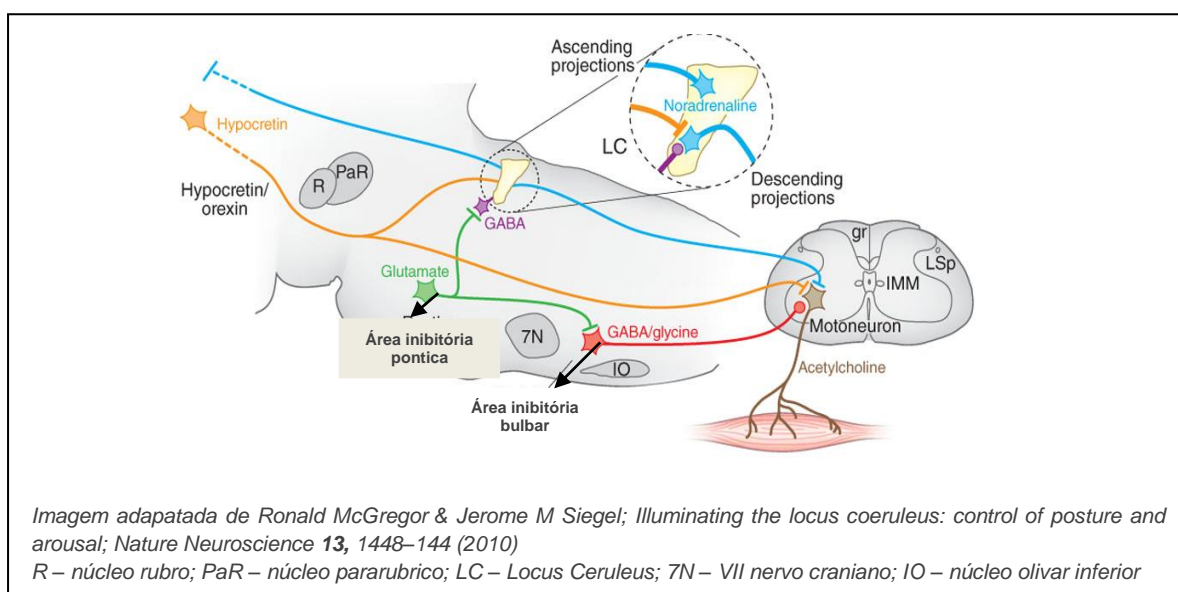
Os núcleos promotores do estado de vigília estão representados a cinzento e os núcleos promotores do sono estão representados a branco. O LC promove a vigília através de projeções excitatórias diretas para o córtex cerebral e para núcleos promotores de vigília, tal como o NPP, e através de projeções inibitórias para núcleos promotores do sono, tais como a APOVL. O LC também inibe a subpopulação de neurónios do NPP promotores do sono REM. O núcleo dorsal da rafe promove a vigília através da ativação do córtex cerebral, sendo este efeito atenuado pela estimulação da interneurónios GABAérgicos que inibem a ATV e o LC. A ATV promove a vigília sobretudo através da ativação do LC e do HL. A APOVL promove o sono através da inibição do TMN e do LC.

Assim, um aumento na actividade do LC favorece o aparecimento de sinais electroencefalográficos de vigília [8] e exerce um efeito inibitório sobre o sono REM, provavelmente através da inibição do grupo de neurónios colinérgicos do NPP responsáveis pelo sono REM [31].

O estado de coma em doentes pós-AVC tem também sido associado a lesões ao nível da porção dorsal superior da protuberância correspondente à região do LC [57].

### 1.1.2 Tónus Muscular

O LC regula alterações do tónus muscular durante a transição sono/vigília. Os neurónios do LC projetam-se diretamente para os motoneurónios gama nos cornos anteriores da medula espinhal, facilitando o tónus muscular postural durante a vigília. As aferências orexinérgicas para o LC e para os motoneurónios gama são fundamentais para este mecanismo [33, 48] (Fig.3). Na transição para o sono e na cataplexia os neurónios do LC ficam inativos, removendo o efeito facilitador do tónus muscular [48, 77].



**Figura 3** - Locus Coeruleus e regulação do tónus muscular.

A imagem ilustra os principais elementos que participam na regulação do tónus muscular, mostrando um corte sagital do tronco cerebral e um corte axial da medula espinhal. Os neurónios orexinérgicos têm um efeito excitatório sobre o LC e sobre os motoneurónios, facilitando o tónus muscular. A perda de tónus muscular no sono REM e na cataplexia resulta não só da perda da facilitação do tónus muscular mas também de uma inibição GABAérgica e glicinérgica dos motoneurónios pela área inibitória bulbar. Os neurónios glutamatérgicos na área inibitória pontica, ativos durante o sono REM, facilitam a libertação de GABA e glicina pela área inibitória bulbar e inibem o LC através de interneurónios GABAérgicos.

### 1.1.3 Ansiedade, Pânico, Memória e Cognição

O LC intervém também nos mecanismos de adaptação ao stress e ao pânico, em virtude das conexões recíprocas que estabelece com o núcleo amigdalino. Estudo efetuados em modelos animais revelaram que a apresentação de paradigmas indutores de stress leva à libertação de vários neurotransmissores ao nível do LC, tais como a noradrenalina, a serotonina e o FLC, ativando-os [68]. Esta activação acompanha-se de aumento do nível de vigília, activação simpática e inibição do sono REM. Estudos de RMf em humanos voluntários demonstraram a activação do LC quando submetidos a paradigmas indutores de estados de stress/medo [42]. A resposta de susto, com contracção involuntária dos músculos faciais perante estímulos súbitos, por exemplo sonoros, deve-se às projeções pelo LC para os motoneurónios do núcleo motor do facial [32].

Modelos de controlo cognitivo postulam um papel modulatório chave do sistema noradrenérgico do LC. Perante estímulos emocionais são ativados circuitos motivacionais e cognitivos através das projecções do LC para o núcleo accumbens, córtex pré-frontal e hipocampo, sendo as duas últimas responsáveis pela atenção selectiva e formação de memórias com conotação emocional, respetivamente. O papel do LC na cognição relacionada com o stress é complexo e multimodal. As projeções noradrenérgicas potenciam a memória de trabalho atuando em receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos. No entanto a excessiva ativação noradrenérgica pode prejudicar a memória de trabalho ao ligar-se aos receptores de baixa afinidade  $\alpha_1$  adrenérgicos. Foi estudado o efeito da ativação do LC em humanos, através da administração de um fármaco estimulante (modafinil), na execução de tarefas cognitivas, com monitorização neuroimagiológica por RMf. A administração de *modafinil* foi associada a aumento da execução de tarefas relacionadas com a activação do LC e do córtex pré-frontal. Estes resultados confirmam o papel do sistema noradrenérgico do LC na função do córtex pré-frontal e no controlo cognitivo em humanos [50].

Assim, o LC tem sido implicado em patologias neuropsiquiátricas, tais como perturbações de ansiedade e pânico, stress pós-traumático, persistência de memórias traumáticas [14] e sintomas ansiogénicos presentes em síndromes depressivas [9].

#### **1.1.4 Nocicepção**

O LC é também um dos centos moduladores da nocicepção, tal como a substância cinzenta peri-aquedutal e os núcleos da rafe. O LC recebe aferências de estímulos termoálgicos, é modulado por projecções da substância cinzenta periaquedutal e do núcleo paragigantocelular do bulbo [66] e emite fibras descendentes que actuam em interneurónios encefalinérgicos situados nos cornos cinzentos posteriores da medula (laminas II e V de *Rexed*), que inibem os impulsos nociceptivos, modulando desta forma os seus efeitos analgésicos [59].

#### **1.1.5 Funções Autonómicas, Hipotalâmicas, Neuroendócrinas e Reflexas**

O LC desempenha um papel fundamental na regulação de funções autonómicas, em conjunto com outros núcleos noradrenérgicos do tronco cerebral, tais como os núcleos noradrenérgicos A1/A5.

O LC exerce influência sobre o sistema nervoso autónomo através de projecções para o núcleo paraventricular do hipotálamo que por seu turno envia múltiplas projecções para os neurónios pré-ganglionares simpáticos localizados nos cornos laterais da medula espinhal e para os neurónios pré-ganglionares parasimpáticos dos nervos cranianos [68]. O LC também emite projecções diretas inibitórias para neurónios pré-ganglionares parassimpáticos, atuando sobre recetores  $\alpha_2$  adrenérgicos [68].

O padrão de ativação distinto do LC, consoante os estímulos, leva a supor a existência de duas subpopulações distintas de neurónios relacionadas com efeitos simpático-excitatórios e parassimpático-inibitórios (fig.4). Assim, estímulos nóxicos (álgicos, aumento excessivo da temperatura ambiental), bem como aferências da via mesocerúlica resultam na ativação relativamente seletiva de neurónios do LC pré-simpáticos, levando a midríase, sem inibição do

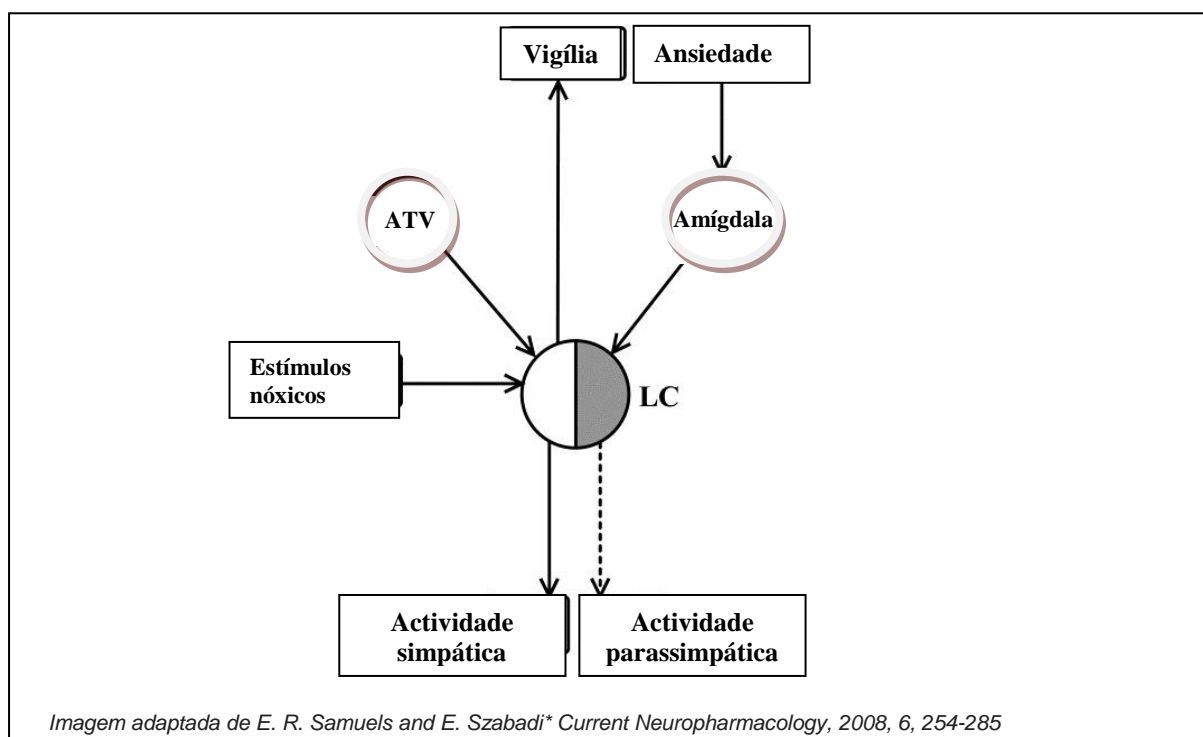
reflexo fotomotor ou de outros reflexos parassimpáticos, tais como a salivação. Por outro lado, estados de ansiedade, provavelmente mediados pela ativação da amígdala, levam à ativação preferencial de neurónios inibitórios pré-parassimpáticos e à inibição dos reflexos fotomotor e da salivação.

A atividade do LC é influenciada por alterações térmicas ambientais através das aferências provenientes do núcleo pré-óptico do hipotálamo. A ativação do LC por temperaturas ambientais elevadas associa-se a ativação do sistema nervoso simpático, manifestando-se por aumento da frequência cardíaca, sudorese, tremor fisiológico das extremidades [1] e redução do tempo de recuperação do reflexo fotomotor [41]. A estimulação cutânea térmica também aumenta a actividade do LC através de aminoácidos excitatórios provenientes do núcleo paragigantocelular [29]. No entanto alterações crónicas de temperatura induzem diminuição da atividade do LC, traduzindo-se por diminuição da expressão da tirosina hidroxilase, enzima fundamental na regulação da síntese de catecolaminas e por aumento da expressão de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos, no caso de exposição crónica ao frio [21, 25].

O LC é um núcleo fundamental na regulação da temperatura em resposta a infeções, sendo a sua ativação regulada pela IL-1 $\beta$  [49, 68].

O LC está envolvido na regulação neuroendócrina através de projeções para os núcleos paraventricular e arqueado do hipotálamo e inibe a secreção de prolactina [66, 68].

O LC tem também um efeito inibitório direto no centro vasomotor, no entanto a ativação do LC resulta em aumento moderado da frequência cardíaca e tensão arterial, indicando a predominância do efeito do aumento do tónus simpático [54, 68]. O LC também exerce um efeito excitatório sobre o centro respiratório aumentando a frequência respiratória [30].



**Figura 4** - Hipotética subdivisão funcional dos neurónios do LC com distintos efeitos no sistema nervoso autónomo.

### 1.1.6 Síndrome de Abstinência aos Opiáceos

O LC é a principal estrutura anatômica o tronco cerebral envolvida na síndrome de abstinência aos opiáceos. O uso prolongado de opiáceos, que actuam a nível dos receptores  $\mu$  dos neurónios do LC, leva a uma dessensibilização dos mesmos, contribuindo para a habituação. Quando a administração de opiáceos cessa, o LC liberta noradrenalina em altas quantidades, causando uma ativação simpática exuberante, responsável pelos sintomas de abstinência, tais como taquicárdia, sudorese, tremores, agitação psicomotora, ansiedade, pânico e alucinações [59].

### 1.1.7 Epileptogénese

Destaca-se também o efeito supressor do LC sobre as crises convulsivas. Existe evidência que o mecanismo anti-convulsivo resultante da estimulação do nervo vago é mediado em grande parte pela estimulação indireta do LC, através das aferências excitatórias provenientes do núcleo do feixe solitário [38]. Em animais, a lesão do LC anula o efeito terapêutico da estimulação do nervo vago [38]. A estimulação do nervo vago é também utilizada nas síndromes depressivas refratárias ao tratamento farmacológico [52].

### 1.1.8 Doenças do Desenvolvimento

Nas perturbações do espectro autista, postula-se que ocorra uma desregulação do sistema noradrenérgico do LC, que é atenuada durante intercorrências febris [49], visto que se verifica uma melhoria clínica comportamental em algumas crianças autistas em contexto de febre [49].

No caso particular da síndrome de Rett, pensa-se que o LC seja um alvo crítico de disfunção, contribuindo para a disfunção ventilatória e cognitiva. Modelos animais com mutação do gene MECP2 exibem redução da transcrição do mRNA da tirosina hidroxilase nas células do LC e alterações morfológicas das espinhas dendríticas [64].

O efeito terapêutico da *atomoxetina*, inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina utilizado no tratamento da perturbação de hiperatividade e défice de atenção, pode estar relacionado com a facilitação das projeções noradrenérgicas provenientes do LC [28].

### 1.1.9 Doenças Neurodegenerativas

Existem alterações anatomopatológicas no LC associadas a várias doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson, paralisia supranuclear progressiva, esclerose lateral amiotrófica, coreia de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Pick [46, 68].

Na doença de Parkinson ocorre uma perda neuronal significativa no LC, que se traduz por diminuição do sinal da neuromelanina em RM. Estudos *pos-mortem* de indivíduos com doença de Parkinson revelam que esta depleção celular é mais acentuada nas células do LC que nos neurónios da *pars compacta* substância *nigra* [81], com aparecimento precoce de corpos de Lewy. Ocorrem também outras alterações nos componentes pré e pós sinápticos das sinapses ao nível do LC, tumefacção do citoplasma, alteração da morfologia das mitocôndrias e encurtamento e diminuição da arborização das dendrites. Existe evidência experimental que as

projeções noradrenérgicas do LC exercem um efeito neuroprotetor sobre os neurónios dopaminérgicos da substância *nigra* [70], tendo um efeito facilitador sobre a via nigro-estriada [71] e modulando desta forma os circuitos extrapiramidais. Os sintomas depressivos que acompanham estas doenças neurodegenerativas podem dever-se em parte à diminuição de inervação noradrenérgica do sistema límbico [63].

Também na doença de Alzheimer, estudos *pos-mortem* confirmam uma perda neuronal precoce a nível do LC, sendo esta mais extensa do que a perda dos neurónios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, correlacionando-se melhor com a duração da doença [12, 24] e ocorrendo também alterações morfológicas nos neurónios do LC.

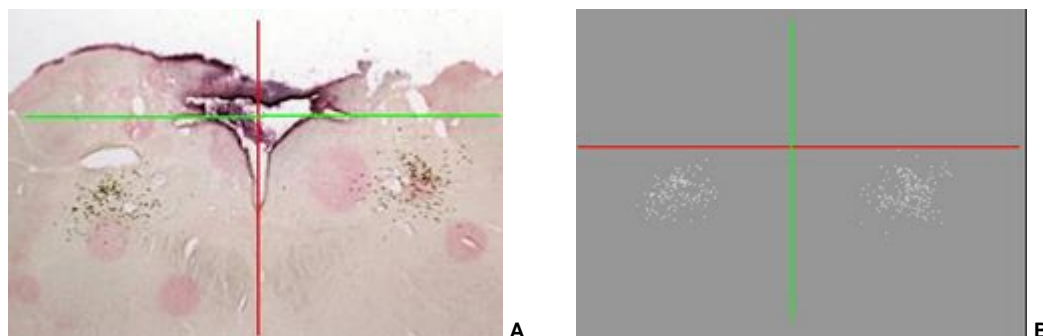
## 1.2 Anatomia Estereotática do LC Humano

A descrição topográfica do LC humano foi publicada pela primeira vez em 1809 por Reil [55, 78], no entanto, a sua localização e configuração tridimensional (3-D) exatas (i.e. a sua anatomia estereotática), bem como a variabilidade dos seus contornos estiveram muito tempo por definir.

O LC, tal como outros núcleos do TC, não é diretamente visualizável nos exames de neuroimagem convencional [11, 13], à exceção das ponderações de alto campo magnético (T1-TSE) ou de campo ultra-alto que detetam o sinal da neuromelanina [35]. O conhecimento da anatomia estereotática do LC tem um potencial interesse para a sua localização precisa *in vivo* e para a aplicação das suas referências 3-D em múltiplos procedimentos, tais como a implantação de sondas estereotáticas e a dissecação microcirúrgica do tronco cerebral.

Por isso, procedeu-se ao estudo da anatomia estereotática do LC humano [22] de acordo com um sistema de referências ortogonais adequado [19, 26, 27], constituído pela linha média, pelo pavimento do IV ventrículo e pela transição bulbo-protuberancial.

Foram estudados 40 LC provenientes de 20 TC humanos adultos, de ambos os sexos (sexo masculino:9; sexo feminino:11), com idades compreendidas entre os 29 e os 92 anos. Estes foram submetidos a cortes isotópicos seriados num criomicrotomo, de forma normalizada, perpendiculares à linha média e ao pavimento do IV ventrículo, com referenciação de posição para possibilitar a localização e a reconstrução 3-D. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e procedeu-se à localização 3-D das células do TC em relação ao sistema de referências ortogonais referido (fig.5).

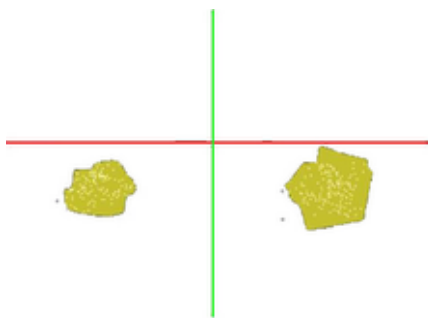


**Figura 5**

**5A** - Referenciação bidimensional (2-D) de um corte histológico, digitalizado em macrosópio com objectiva plan-apocromática e câmara fotográfica digital acoplada, com marcação da posição da linha média (X-X'), do pavimento do IV ventrículo (Y-Y') e do nível crânio-caudal do corte (Z-Z'); **5B** - Marcação, na imagem digitalizada, das células do LC com referenciação 2-D automática.

Determinaram-se os contornos de cada LC a partir da respetiva distribuição celular bidimensional (2-D), utilizando-se os contornos de inclusão de 90 e 95% das células (fig.6) e fez-se a reconstrução 3-D dos contornos do LC a partir da integração dos contornos 2-D (Fig.8).

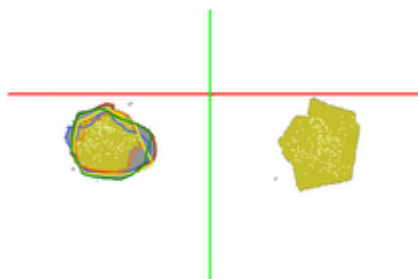




**Figura 6** – Contornos 2-D da densidade celular.

*Traçado dos contornos bidimensionais do LC no mesmo plano, com referência 2-D (inclusão de 95% das células).*

Procedeu-se à análise comparada da variabilidade 2-D intercasos do LC, plano a plano, através dos contornos coplanares correspondentes a 50, 75, 90 e 95% das células respectivas e da variabilidade 3-D, a partir da reconstrução dos contornos 2-D plano a plano (fig. 7). Para o estudo da variabilidade baseado na distribuição das células do LC, cada metade do tronco cerebral (esquerdo e direito) foi considerado como um caso distinto.



**Figura 7** – Lado esquerdo: sobreposição dos contornos 2D (inclusão

*de 95, 90, 75, 50% das células) para o estudo da variabilidade intercasos.*

Constatou-se que os comprimentos médios ( $\pm$  desvio padrão) da protuberância e do LC são respetivamente  $26,4 \pm 1,59\text{mm}$  e  $14,1 \pm 1,11\text{mm}$ , nos indivíduos do sexo masculino, e de  $27,4 \pm 1,36\text{mm}$  e  $14,9 \pm 1,4\text{mm}$  nos indivíduos do sexo feminino. Verificou-se marcada variabilidade das dimensões do LC de indivíduo para indivíduo, sem evidente assimetria esquerda/direita. O comprimento do LC variou entre 12,0mm e 17,0mm, sendo a média do comprimento do LC de  $14,5 \pm 1,3\text{mm}$ . A largura média foi de  $1,4 \pm 0,2\text{mm}$  e a altura (dorso-ventral) média foi de  $1,3 \pm 0,2\text{mm}$ .

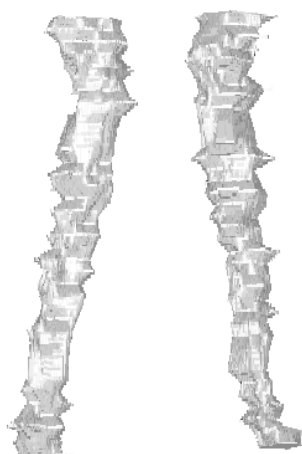
Na globalidade, o LC pode encontrar-se entre 7,5mm e 27,5mm acima da transição bulbo-protuberancial. Os níveis acima da transição bulbo-protuberancial situados entre 14,0mm e 21,5mm são comuns a todos os LC; os níveis situados entre 13,5mm e 14,0mm e entre 21,5mm e 23mm são comuns a 90% dos casos e os níveis situados entre 13mm e 13,5mm e entre 23,5mm e 24mm são comuns a 80% dos casos (tabela 1).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+ 27,5 mm							28						36	36						
							27						35	35						32
+ 24 mm				41	41		26			40	34		34	34			42			31
				40	39		25			39	33		33	33			41			30
+ 23,5 mm				39	38	32	24			38	32		32	32			40	37	30	29
				38	37	31	23			37	31		31	31		31	39	36	29	28
	40			37	36	30	22			36	30		30	30		30	38	35	28	27
	39		37	35	35	29	21	33		35	29		29	29		29	37	34	27	26
	38		35	34	34	28	20	32	29	34	28		28	28	36	28	36	33	26	25
	36	49	34	33	33	27	19	31	28	33	27		27	27	35	27	35	32	25	24
	35	48	32	32	32	26	18	30	27	32	26		26	26	34	26	34	31	24	23
	34	46	31	31	31	25	17	29	26	31	25		25	25	33	25	33	30	23	22
+ 21,5 mm	32	45	29	30	30	24	16	28	25	30	24	28	24	24	32	24	32	29	22	21
	31	43	28	29	29	23	15	27	24	29	23	27	23	23	31	23	31	28	21	20
	30	42	26	28	28	*	14	26	23	28	22	26	22	22	30	22	30	27	20	19
	28	40	25	26	27	*	13	25	22	27	21	25	21	21	29	21	29	26	19	18
	27	39	23	25	26	20	12	24	21	26	20	24	20	20	28	20	28	25	18	17
	26	37	22	24	25	*	11	23	20	25	19	23	19	19	27	19	27	24	17	16
	24	36	20	23	24	*	10	22	19	24	18	22	18	18	26	18	26	23	16	15
	23	34	19	22	23	17	9	21	18	23	17	21	17	17	25	17	25	22	15	14
	22	33	17	21	22	16	8	20	17	22	16	20	16	16	24	16	24	21	14	13
	20	31	16	20	21	15	7	19	16	21	15	19	15	15	23	15	23	20	13	12
	19	30	14	19	19	14	6	18	15	20	14	18	14	14	22	14	22	19	12	11
	18	28	13	17	18	13	5	17	14	19	13	17	13	13	21	13	21	18	11	10
	16	27	12	16	17	12	4	16	13	18	12	16	12	12	20	12	20	17	10	9
	15	25	9	15	16	11	3	15	12	17	11	15	11	11	19	11	19	16	9	8
	14	24	8	14	15	10	2	14	11	16	10	14	10	10	18	10	18	15	8	7
	12	22	7	13	14	9	1	13	10	15	9	13	9	9	17	9	17	14	7	6
+ 14,0 mm	11	21	5	12	13	8		12	9	14	8	12	8	8	16	8	16	13	6	5
	10	19	4	11		7		11	8	13	7	11	7	7	15		15	12	5	4
	8	18	2	10		6		10	7	12	6	10			14		14	11	4	3
		16	1					9	6	11	5	9			13		13	10	3	
+ 13,5 mm		15						8	5	10		8			12		12	9	2	
		13						7	4	9		7			11		11	8	1	
		12						6	3	8		6			10					
								5	2	7		5			9					
+ 13 mm							4	1				4			8					
												3			7					
												2			6					
												1			5					
+ 7,5 mm															4					

**Tabela 1** – Distribuição crânio-caudal dos 20 pares de LC.

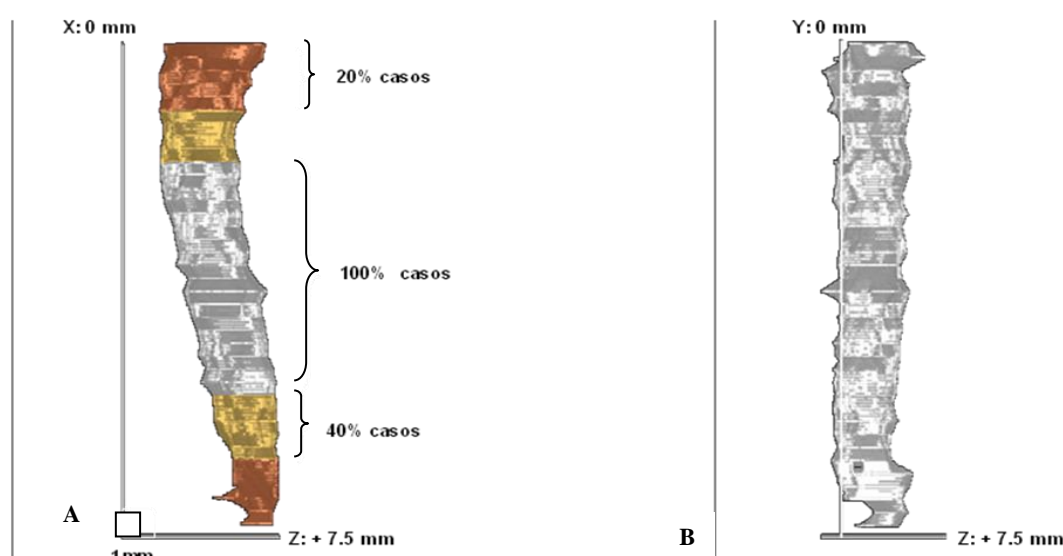
As diferentes gradações de cores representam a distribuição dos pares de LC ao longo da protuberância, correspondendo aos níveis de inclusão de 100% dos casos (cinzento), 90% dos casos (amarelo) e 80% dos casos (laranja).



**Figura 8** – Reconstrução 3-D do LC humano

O centro anatômico do LC humano encontra-se, em média, a uma distância de  $3,2 \pm 0,3$  mm da linha média (mínimo: 2,6 mm; máximo: 3,7 mm), a  $1,1 \pm 0,2$  mm do pavimento do IV ventrículo (mínimo: 0,8 mm; máximo: 1,6 mm) e a  $18,5 \pm 1,5$  mm (mínimo: 15,0 mm; máximo: 20,5 mm) do plano da transição bulbo-protuberancial.

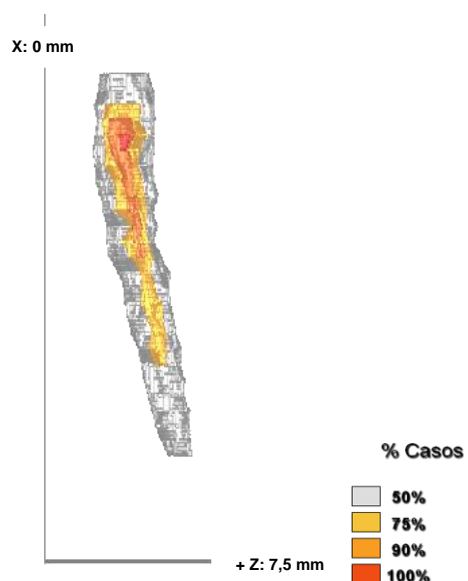
Relativamente à configuração 3-D verificou-se que o LC humano tem uma forma grosseiramente cilíndrica, mais alongada do que previamente descrita, divergindo no sentido caudal a partir da transição do  $\frac{1}{4}$  superior para os  $\frac{3}{4}$  inferiores e afastando-se progressivamente da linha média e do pavimento do IV ventrículo (fig.9). Na zona central as células do LC encontram-se mais concentradas na porção média do núcleo.



**Figura 9** – Reconstrução 3-D do LC e variabilidade intercasos do nível crânio-caudal.

**9A** – Vista frontal – eixo X representa o plano da linha média; **9B** – Vista lateral – eixo Y representa o plano do pavimento do IV ventrículo.

Demonstrou-se que não existe correlação entre tamanho do LC, o sexo e a idade dos indivíduos estudados e a altura da protuberância. O estudo de variabilidade intercasos 2-D e 3-D revelou que este núcleo tem uma localização espacial dispersa em torno de uma zona central comum a todos os casos e que esta dispersão é globalmente concêntrica, predominando na extremidade caudal (fig.10).



**Figura 10** - Variabilidade intercasos, contornos e referência 3-D

Concluiu-se que o LC humano é um núcleo simétrico, de configuração aproximadamente cilíndrica, mais longo do que previamente descrito ( $14,5 \pm 1,3 \text{ mm}$ ), com localização subependimária na metade superior do pavimento do IV ventrículo.

## 1.3 Caracterização Neuroquímica do LC

### 1.3.1 Aferências e Neuroreceptores do LC

Os circuitos neuroquímicos que o LC integra estão extensamente estudados em animais, mas há poucos estudos em humanos. Os métodos geralmente aplicados para o estudo das projecções eferentes, baseiam-se sobretudo em técnicas de degenerescência axonal e transporte axonal anterógrado e retrógrado, cuja aplicação em humanos é inviável em condições de colheita de material autóptico. O estudo das aferências em encéfalos humanos *pos-mortem* é mais aplicável, visto que os neuroreceptores sofrem um processo de autólise *pos-mortem* mais lenta que os neurotransmissores.

De entre os principais tipos de receptores conhecidos no LC destacam-se os adrenérgicos:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\beta$ . Em roedores, a distribuição dos receptores  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  ao longo do eixo antero-posterior do LC é heterogénea, no que respeita à sua densidade e à afinidade pelos ligandos [54]. Apesar de os receptores  $\alpha 2$  terem uma distribuição difusa pelo sistema nervoso central, em modelos animais parecem ter um papel preponderante a nível do LC, na inibição da libertação de noradrenalina relativamente a outras áreas do sistema nervoso central e, tal como o córtex [5] também a nível do LC predominam os receptores do subtipo  $\alpha 2A$  [54]. Tendo em conta a ativação do LC em situações de ansiedade e pânico, possivelmente alguns agentes farmacológicos tais como os agonistas  $\alpha 2$  e  $\beta$ -bloqueantes, medeiam os seus efeitos ansiolíticos ao atuarem nos seus receptores-alvo a nível do LC.

Os receptores serotoninérgicos também estão amplamente documentados no LC de animais, sobretudo dos subtipos 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> [54]. Em animais, agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> medeiam a inibição do LC [54], sendo possivelmente este o mecanismo dos ansiolíticos agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> em humanos.

Estão também documentados terminais dopaminérgicos a nível do LC, que estabelecem sinapses axono-dendríticas e axonossomáticas com os neurónios do LC, onde se encontram receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> [44, 54]. A dopamina tem um efeito ativador sobre o LC, contribuindo para a promoção do estado de vigília.

Os receptores de orexina estão documentados em quantidade abundante ao nível do LC, predominando o subtipo OXR<sub>1</sub> em animais roedores [65]. Está também documentada uma forma de narcolepsia hereditária autossómica recessiva, em animais caninos, associada a mutações dos receptores do subtipo OXR<sub>2</sub> [10].

Em animais, estão presentes receptores de FLC no LC, existindo também evidência da sua presença em humanos. Um estudo em encéfalos *pos-mortem* de indivíduos com antecedentes de Perturbação Depressiva Major revelou uma maior quantidade de terminais nervosos FLC imunorreactivos, comparativamente com encéfalos controlo de indivíduos saudáveis [9].

Os receptores ópioides  $\mu$  são fundamentais nos mecanismos de dependência a drogas e os receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> medeiam os circuitos da sedação [68].

Existem outros receptores com uma importância fulcral na modulação da activação e inibição do LC, tais como os receptores de glutamato NMDA e não NMDA, receptores GABA-A, e os receptores de acetilcolina [68].

### 1.3.2 Receptores Dopaminérgicos do LC

As aferências dopaminérgicas são fundamentais na modulação do ciclo sono/vigília, tal como sugerem estudos de microdiálise reversa, em que a aplicação de dopamina tem uma acção excitatória sobre neurónios promotores da vigília do LC, inibindo o sono [15].

As aferências dopaminérgicas do LC provêm sobretudo da ATV, constituindo a via mesocerúlica, já documentada em vários estudos [18, 47, 69, 56]. O envolvimento da ATV na promoção da vigília em humanos é suportado pela evidência de que a ativação da ATV produz dessincronização electroencefalográfica cortical acompanhada por aumento do estado de alerta [17].

Tem sido proposto que os inibidores da recaptção de dopamina utilizados no tratamento da sonolência excessiva associada à narcolepsia, tais como o *modafinil*, levam à ativação do LC através da via mesocerúlica [66]. Um estudo em modelo animal [60] revelou que tanto os antagonistas dos neuroreceptores dopaminérgicos D1 como os D2 bloqueiam o efeito promotor da vigília de baixas doses do deste fármaco. No entanto, na presença de doses elevadas, apenas os antagonistas dos receptores D2 atenuam o seu efeito. Estes resultados sugerem que ambos os receptores dopaminérgicos são fundamentais para o efeito promotor de vigília deste fármaco, desempenhando os receptores D2 um papel mais preponderante. Os mesmos autores demonstraram recentemente o papel essencial dos receptores D2 na manutenção da vigília, sem no entanto interferirem na regulação homeostática do sono não-REM [61].

Existem duas famílias de receptores dopaminérgicos: os receptores D1-like que inclui os subtipos D1 e D5; e os receptores D2-like que inclui os subtipos D2, D3 e D4. Os subtipos D1 e D2 são os mais abundantes no sistema nervoso central. Estudos de quantificação do mRNA dos receptores dopaminérgicos efetuados em encéfalo de roedor revelam que existe um franco predomínio de receptores D2 a nível do LC [45, 76].

## 2. OBJETIVOS

Estudo da localização imunohistoquímica dos neuroreceptores dopaminérgicos dos subtipos D1 e D2 (D1R e D2R) ao longo da extensão do LC humano e a nível intracelular

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Foram estudados 8 LC provenientes de 4 encéfalos de indivíduos adultos de ambos os sexos, sem deformação anatômica ou histológica aparente, sem antecedentes de doença neurológica conhecidos, obtidos por autópsia nas primeiras 48h *pos-mortem*, após consulta do Registo Nacional de Não Dadores (RENDA), provenientes da Delegação de Lisboa do Instituto Nacional de Medicina Legal.

#### Equipamento e reagentes

- Contentores para armazenamento dos encéfalos
- Paraformaldeído a 8%
- Instrumentos de dissecação
- Suporte em acrílico para normalização da posição do bloco anatômico
- Parafina
- Meio de inclusão
- Peças de metal para molde de inclusão de parafina
- Micrótomo Leica RM22555®
- Reagentes, material de laboratório e equipamento para histologia
- Anticorpos primários: anticorpo policlonal criado em coelho anti-receptor dopaminérgico D1 (D1DR (H-109): sc-14001®); anticorpo monoclonal criado em rato anti-receptor dopaminérgico D2 (D2DR (B-10): sc-5303®)
- Anticorpos Secundários: anticorpo criado em caprino anti-IgG de coelho para os receptores D1 (Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) \*2 mg/mL\*); anticorpo criado em caprino anti-IgG de rato para os receptores D2 (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) \*2 mg/mL\*) – (ver tabela 2)
- Computador com software adequado para arquivo e processamento digital de imagens e software para quantificação de imunofluorescência (Image J®)
- Microscópio de Fluorescência Leica DM 2000®, com câmara Leica DFC 420C®
- Microscópio Confocal Zeiss LSM 510 Meta®
- Frigorífico Electrolux® e arca frigorífica Whirlpool®

Fluorocromo do anticorpo secundário	$\lambda$ de excitação (nm)	$\lambda$ de emissão (nm)	Filtro	$\lambda$ de excitação (nm)	$\lambda$ de emissão (nm)	Cor	Anticorpo primário
Alexa Fluor 488	495	519	L5	440-520	497-557	Verde	Anti-DR2
Alexa Fluor 568	578	603	N2.1	515-560	590	Vermelho	Anti-DR1

**Tabela 2** – Representação dos fluorocromos utilizados para a marcação de D2R e D1R, respetivos filtros do microscópio de fluorescência Leica DM 2000® e cor com que são visualizados. Indicam-se também os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de excitação e emissão dos fluorocromos e respetivos filtros.

NOTA: Utilizou-se o corante fluorescente DAPI para marcação do DNA nuclear, visível no filtro A, correspondente à luz azul ( $\lambda$  de excitação 358 nm e  $\lambda$  de emissão de 461 nm).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Recolha e processamento das peças anatómicas**

- Obtenção dos encéfalos por autópsia de rotina, nas primeiras 48h após a morte;
- Fixação dos encéfalos usando uma solução de paraformaldeído a 8%, durante um período entre 3 a 4 semanas;
- Dissecção dos blocos anatómicos (troncos cerebrais), por secção do mesencéfalo, pedúnculos cerebelosos e bulbo raquidiano;
- Medição das alturas das protuberâncias;
- Colocação de agulhas transfixivas de referência.

### **3.2.2 Processamento anatómico e histoquímico**

- Fixação definitiva do bloco durante mais de 48 horas em solução de formol e sucrose;
- Processamento automático do bloco, que incluiu desidratação e saturação em parafina líquida;
- Inclusão do bloco em parafina líquida num molde adequado, em posição referenciada e normalizada (de forma a que a linha média do TC e o pavimento do IV ventrículo sejam perpendiculares aos planos de corte) e solidificação por arrefecimento em ar ambiente;
- Remoção do molde e das agulhas de referência e colocação do bloco na platina do micrótomo Leica RM22555®;
- Execução de cortes isotópicos seriados no micrótomo com a espessura de 5 µm perpendicularmente à linha média do TC e ao pavimento do IV ventrículo, ao longo de toda a protuberância. Em cada série de 500 µm (100 cortes) são colhidos 3 cortes uniformemente espaçados;
- Marcação imunohistoquímica com fluorescência para D1R e D2R (vide protocolo de imunofluorescência\*).
- Caracterização da especificidade dos anticorpos:
  - Controlos negativos obtidos pela marcação imunohistoquímica das células do LC com omissão do anticorpo primário;
  - Controlos positivos obtidos pela marcação imunohistoquímica de tecido cerebral rico em receptores dopaminérgicos (estriado ventral – núcleo accumbens);
- Controlo histológico e citológico para melhor visualização dos neurónios com neuromelanina, através da coloração de um corte histológico em cada série com hematoxilina.

\* Protocolo de Imunofluorescência

Todos os reagentes foram equilibrados para a temperatura ambiente (20-25°C) antes da imunomarcação e todas as incubações foram efectuadas à temperatura ambiente.

1. Desparafinização e reidratação
  - Desparafinização das lâminas colocando-as em 2 banhos de xilol limpo durante 5 minutos cada;
  - Lavagem das lâminas num banho de acetona durante 5 minutos;
  - Lavagem sucessiva, durante 3 minutos, em: etanol absoluto (2 banhos), etanol 95% (1 banho) e água destilada.
2. Recuperação antigénica
  - Aquecimento de tampão citrato em banho-maria a 95-100°C
  - Incubação das lâminas no recipiente com tampão durante 25 minutos;
  - Arrefecimento à temperatura ambiente durante 25 minutos o recipiente com o tampão
  - Lavagem das lâminas com solução tampão (PBS) durante 2 minutos.
3. Bloqueio de ligações não específicas
  - Colocação das lâminas num banho de tampão limpo durante 2 minutos;
  - Remoção do excesso de tampão;
  - Delimitação do tecido com a caneta hidrofóbica;
  - Incubação com Image-iT™ FX signal enhancer durante 30 min;
  - Decantação da mistura e lavagem 2x em PBS, durante 2 min cada;
  - Aplicação da solução de Bloqueio em quantidade suficiente para cobrir o tecido;
  - Incubação durante 15 minutos;
4. Incubação com o anticorpo primário
  - Aplicação do anticorpo primário diluído a 1:200;
  - Incubação durante 60 minutos;
  - Lavagem 3x em PBS, durante 2 min cada.
5. Incubação com o anticorpo secundário
  - Remoção do excesso de tampão e limpar as lâminas como anteriormente;
  - Aplicação do Anticorpo Secundário diluído 1:200;
  - Incubação durante 60 minutos;
  - Lavagem 3x em PBS, durante 2 min cada.
6. Coloração
  - Aplicação da solução preparada do Fluorocrómo;
  - Incubação durante 30 minutos;
  - Protecção das lâminas da luz a partir deste passo;
  - Lavagem 3x em PBS, durante 2 min cada.
7. Contra coloração
  - Imersão das lâminas num banho de Hematoxilina de Mayer (20-30 segundos);
  - Lavagem em banho de água destilada;



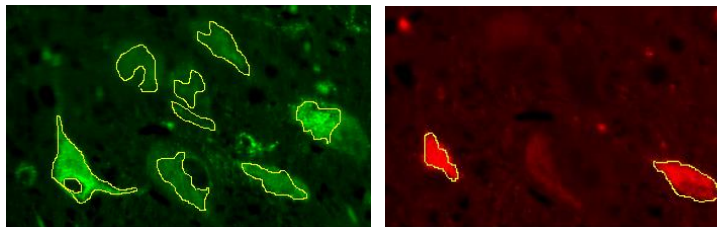
- Banho das lâminas em água de amônia 1%.
  - Banho de água destilada durante 2-5 min;
8. Montagem
- Aplicação de ProLong® Gold + DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol);
  - Colocação de lamela.
  - Armazenamento das lâminas em ambiente escuro entre - 20°C e 4°C

### 3.2.3 Análise qualitativa da localização imunohistoquímica diferencial de D1R e D2R

- Observação das lâminas histológicas ao microscópio de fluorescência óptica;
- Análise da distribuição diferencial de D1R e D2R ao longo da extensão do núcleo, aferindo se existem regiões preferenciais de localização;
- Análise dos compartimentos intracelulares em que se localizam os neuroreceptores;
- Análise da co-localização dos neuroreceptores através da sobreposição de imagens obtidas no microscópio de fluorescência e observação da marcação imunohistoquímica ao microscópio confocal.

### 3.2.4 Análise semiquantitativa de D1R e D2R

- Semiquantificação da imunoreactividade observada para D1R e D2R no Image J 1.44®:
  - Um número de cortes histológicos, uniformemente espaçados, foram selecionados em cada LC estudado, de acordo com a qualidade da preservação histológica e qualidade da marcação imunohistoquímica;
  - As zonas de imunoreactividade foram identificadas e selecionadas para cada subtipo de receptor, nas ampliações de 200 – 400x;



- Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.
- Análise da distribuição da imunoreactividade observada para D1R e D2R ao longo da extensão craniocaudal em cada um dos LC estudados;
- Representação da imunoreactividade diferencial para D1R e D2R para cada um dos LC estudados, em diagrama de extremos e quartis;
- Em cada LC, os valores da imunoreactividade para ambos os subtipos D1R e D2R, foram submetidos ao teste de Wilcoxon ( $\alpha < 0,05$ ), para comparar as diferenças.

Para a análise qualitativa e semiquantitativa da distribuição de D1R e D2R cada LC (direito e esquerdo) foi considerado como um caso distinto.

## 4. RESULTADOS

Os 4 encéfalos estudados foram provenientes de indivíduos sem antecedentes de patologia neurologia conhecida, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 40 e 78 anos (tabela 3).

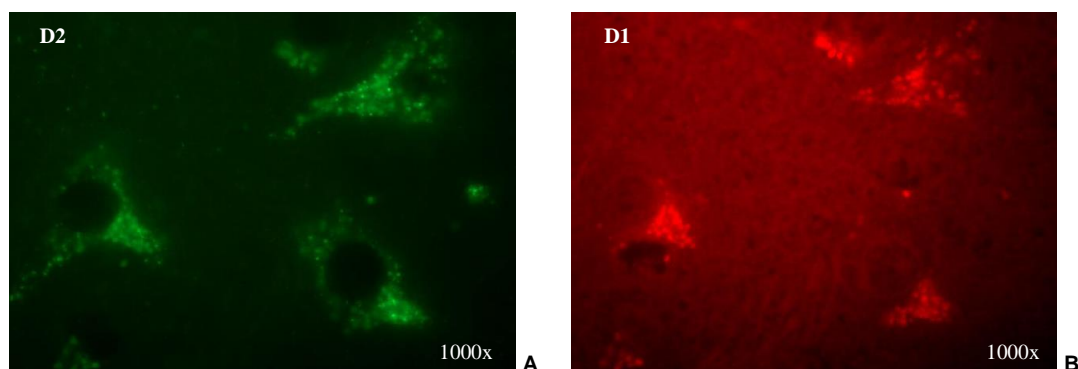
Tronco Cerebral (TC)	Idade (anos)	Sexo	Altura da protuberância (mm)	Tempo de fixação (semanas)
TC1	78	masculino	28	3
TC2	40	feminino	30	4
TC3	59	feminino	28	4
TC4	57	masculino	26	3

**Tabela 3** – Dados demográficos dos indivíduos e respectivos tempos de fixação dos encéfalos.

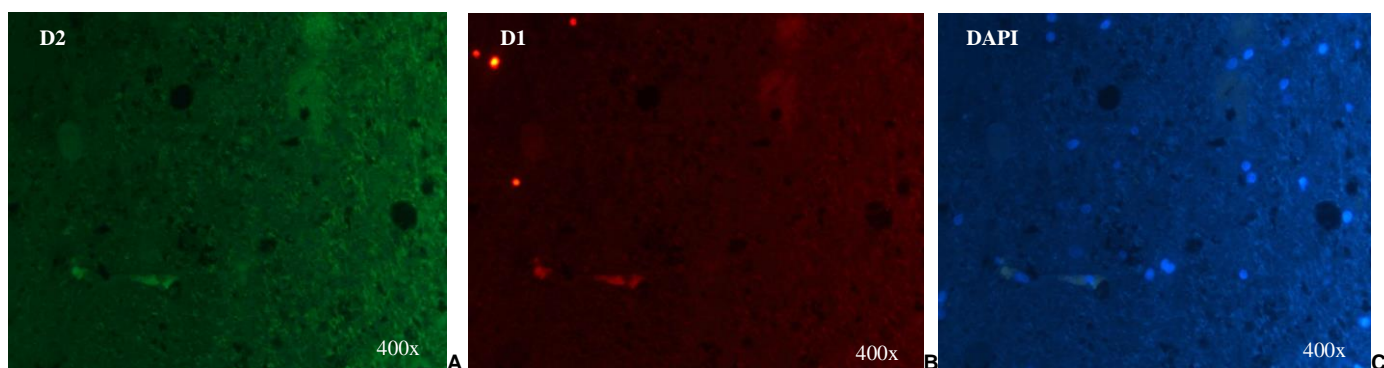
### 4.1 Especificidade dos anticorpos anti D1R e D2R

A especificidade dos anticorpos primários anti-D1R e anti-D2R usados neste estudo já foi previamente caracterizada em estudos de Western Blotting, imunoprecipitação, imunohistoquímica e imunofluorescência [78, 79].

Neste estudo, para a determinação da especificidade dos anticorpos anti-receptores (D1R e D2R) utilizaram-se dois critérios: aplicação da marcação imunohistoquímica no núcleo accumbens humano, visto tratar-se de uma região do cérebro rica em D1R e D2R [76], funcionando como controlo positivo (fig.10); e a aplicação da marcação imunohistoquímica no LC humano com omissão do anticorpo primário, funcionando como controlo negativo (fig.11).



**Figura 10** - Marcação imunohistoquímica com fluorescência de D2R e D1R (A e B, respetivamente) no núcleo accumbens humano.



**Figura 11** - Marcação imunohistoquímica com fluorescência, com omissão do anticorpo primário para D2R e D1R nas células do LC humano.

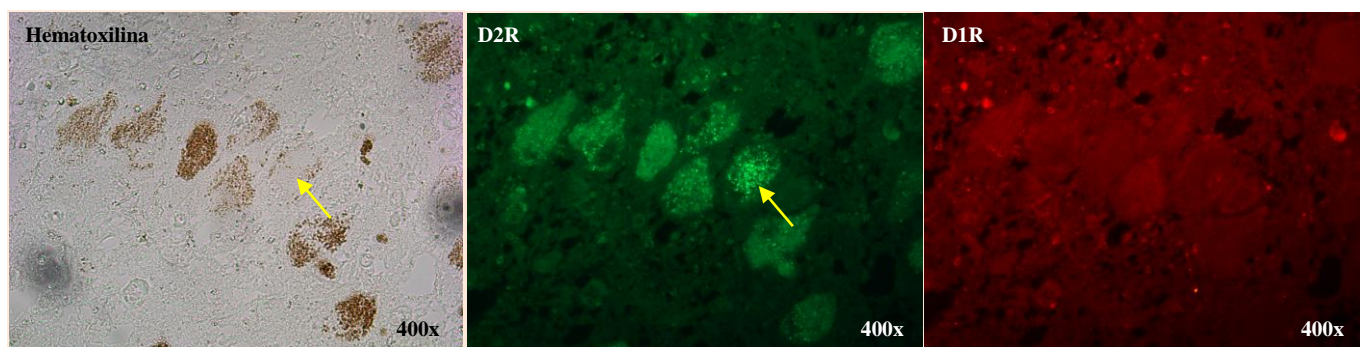
**11A** – Ausência de marcação para D2R; **11B** – Ausência de marcação para D1R; **11C** – Marcação do DNA nuclear com DAPI.

Confirmou-se a presença de imunoreactividade no núcleo accumbens humano e a ausência de imunoreactividade nos controlos negativos da marcação imunohistoquímica do LC humano. Estes dados confirmam que a imunoreactividade obtida para D1R e D2R com os anticorpos utilizados é específica.

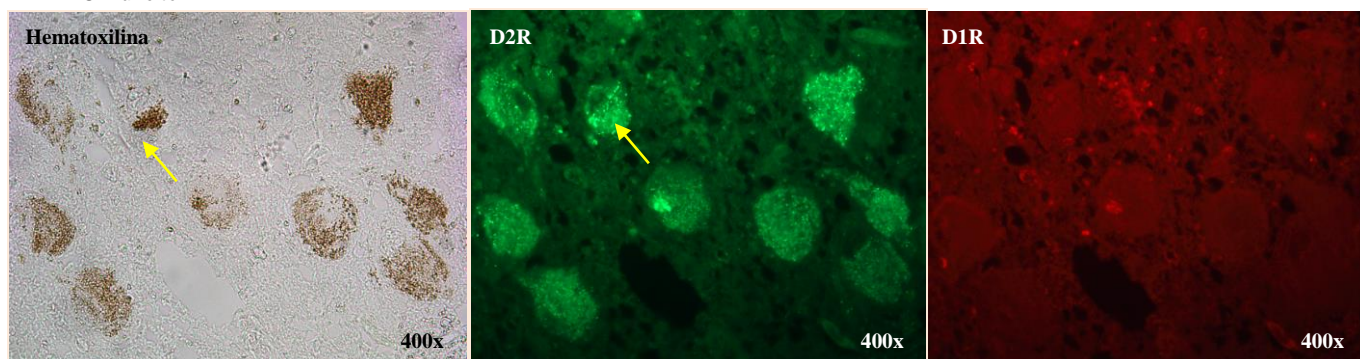
#### 4.2 Localização imunohistoquímica de D1R e D2R

Verificou-se imunoreactividade para D2R na generalidade dos neurónios do LC, em toda a extensão crânio-caudal do núcleo. A nível intracelular, observou-se uma marcação com aspeto granulado fino a nível do citoplasma, da porção proximal dos prolongamentos dendríticos e da membrana citoplasmática. A marcação observa-se em extensas áreas de citoplasma, estendendo-se para além dos compartimentos citoplasmáticos contendo grânulos de neuromelanina e sendo a sua intensidade independente da presença dos grânulos de neuromelanina (fig. 12 e 13).

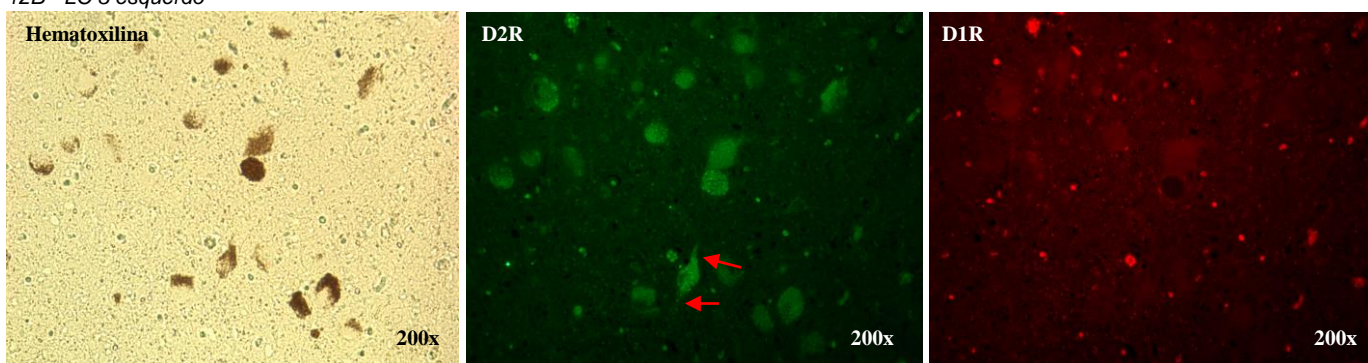
Relativamente aos D1R, verificou-se uma marcação bastante mais esparsa comparativamente com os D2R. Na maioria dos cortes histológicos observados não se verificou qualquer imunoreactividade para D1R (fig. 12). As células do LC que exibem marcação para D1R são habitualmente neurónios com pouco conteúdo de grânulos de neuromelanina. A nível intracelular, a marcação aparece predominantemente a nível do citoplasma, aglomerada em compartimentos citoplasmáticos mais restritos, comparativamente com D2R (fig.13). Em alguns neurónios também se verificou marcação a nível da porção proximal dos prolongamentos dendríticos e a nível da membrana citoplasmática (fig. 16A).



12A – LC 1 direito



12B - LC 3 esquerdo



12C - LC 2 esquerdo

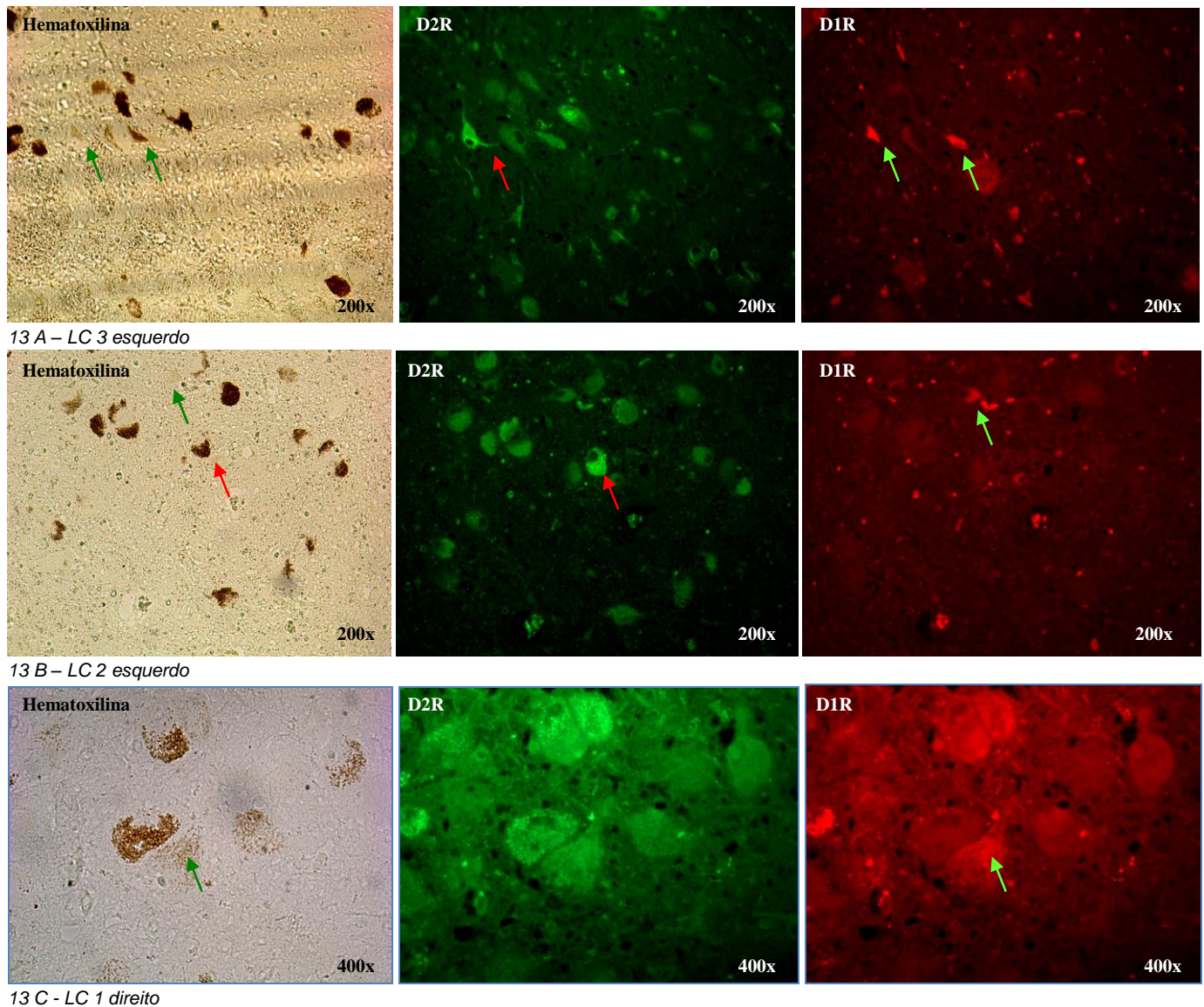
**Figura 12** – Marcação imunohistoquímica com fluorescência das células do LC em cortes histológicos em que apenas se verificou marcação para D2R.

Em cada caso ilustrado (A, B e C) apresenta-se sequencialmente da esquerda para a direita um corte histológico corado com hematoxilina e um corte histológico adjacente com marcação simultânea para D2R e D1R no filtro N5 (luz verde) para visualização de D2R e no filtro N2.1 (luz vermelha) para visualização de D1R.

**12A e 12B** (ampliação 400x) – Os neurónios do LC exibem uma marcação com aspeto ponteados em extensas áreas de citoplasma, estendendo-se para além dos compartimentos contendo grânulos de neuromelanina (setas amarelas).

**12C** (ampliação 200x) – Verifica-se imunoreactividade em todas as células do LC a nível do citoplasma e dos prolongamentos dendríticos (setas vermelhas).





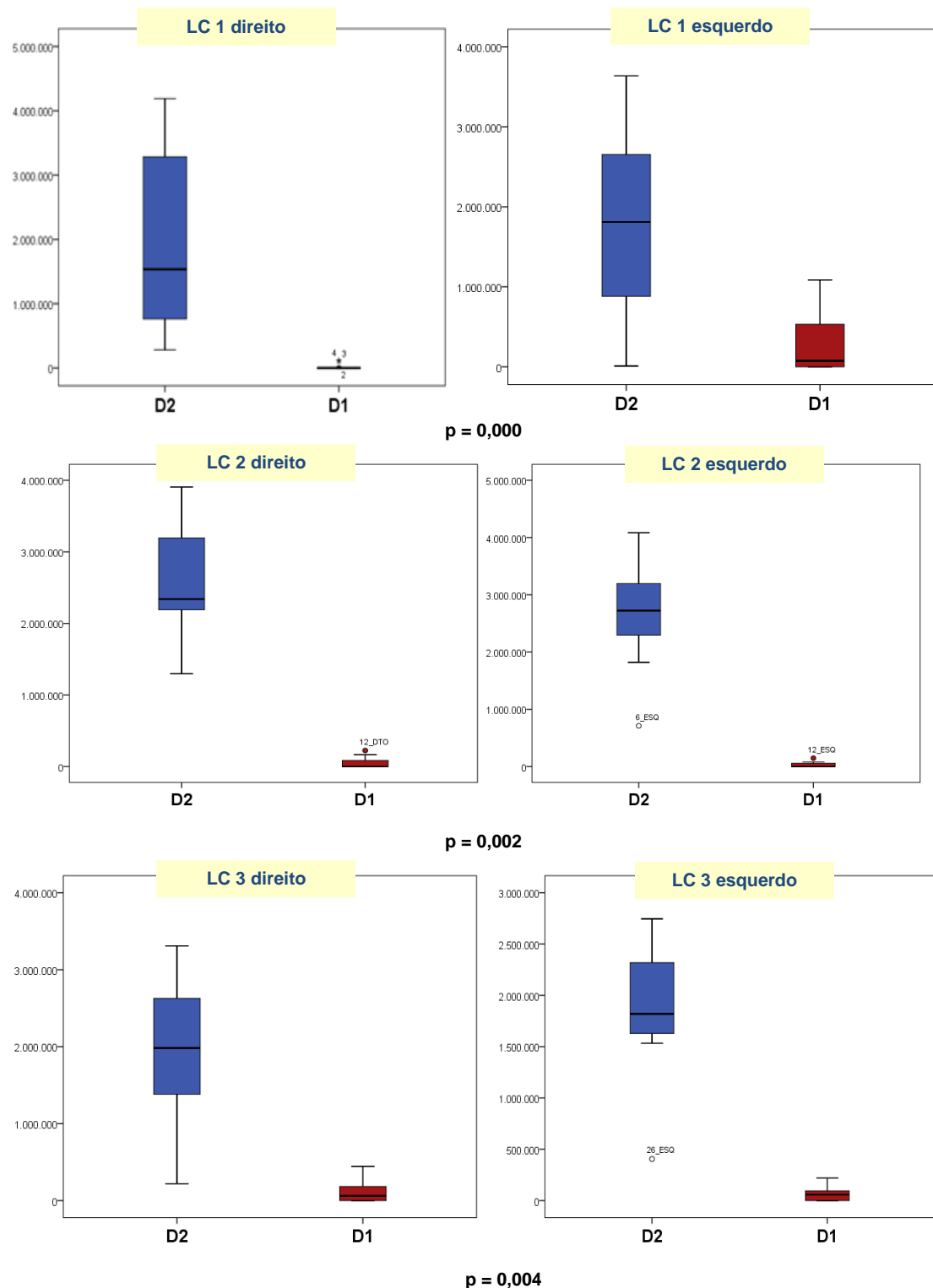
**Figura 13** – Marcação imunohistoquímica com fluorescência das células do LC em cortes histológicos em que se verificou marcação para ambos os neuroreceptores de dopamina D2R e D1R.

Em cada caso ilustrado (A, B e C) apresenta-se sequencialmente da esquerda para a direita um corte histológico corado com hematoxilina e um corte histológico adjacente com marcação simultânea para D2R e D1R no filtro N5 (luz verde) para visualização de D2R e no filtro N2.1 (luz vermelha) para visualização de D1R.

**12A e 12B** (ampliação 200x) – Os D2R estão presentes na generalidade das células em áreas de citoplasma que se estendem para além dos compartimentos contendo grânulos de neuromelanina e também a nível dos prolongamentos dendríticos (setas vermelhas); Os D1R estão presentes em células pobres em grânulos de neuromelanina em compartimentos citoplasmáticos mais restritos (setas verdes).

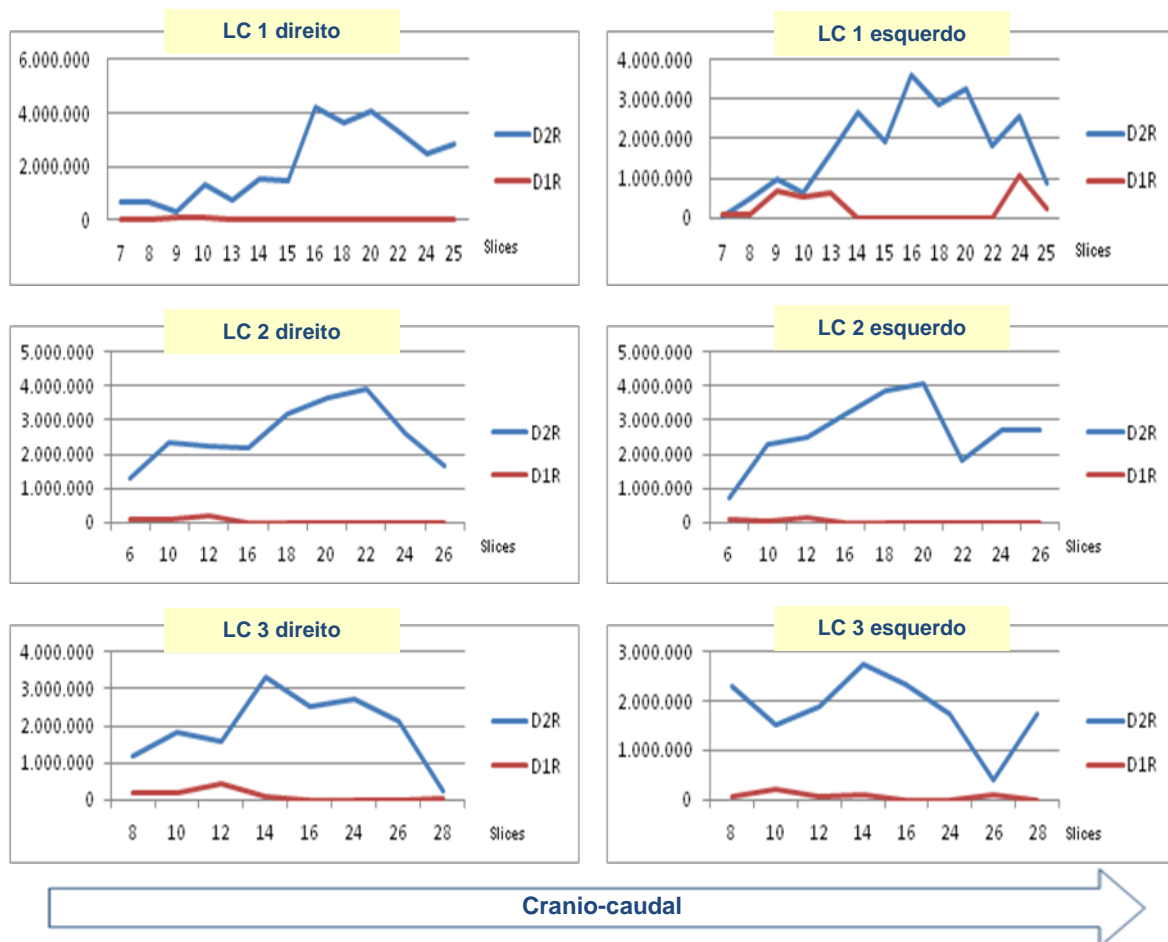
**12C** (ampliação 400x) – Todas as células do LC exibem imunoreactividade para D2R; as células que exibem imunoreactividade para D1R são pobres em grânulos de neuromelanina (seta verde).

Nos 6 LC em que se procedeu à análise semiquantitativa dos neuroreceptores dopaminérgicos (Fig.14) verificou-se que os D2R são significativamente mais abundantes que os D1R ( $p \leq 0,004$ ).



**Figura 14** – Representação gráfica em diagrama de extremos e quartis com caixa de bigodes do diferencial da imunoreactividade expressa em unidades arbitrárias de fluorescência para D2R (barra azul) e D1R (barra vermelha). Em cada par de LC (1, 2 e 3) foi analisado um dado número de cortes histológicos uniformemente espaçados ao longo da extensão cranio-caudal do núcleo (13, 9 e 8, respetivamente). Para comparar as medianas da imunoreactividade foi aplicado o teste de Wilcoxon, obtendo um resultado estatisticamente significativo ( $p \text{ value} \leq 0,004$ ).

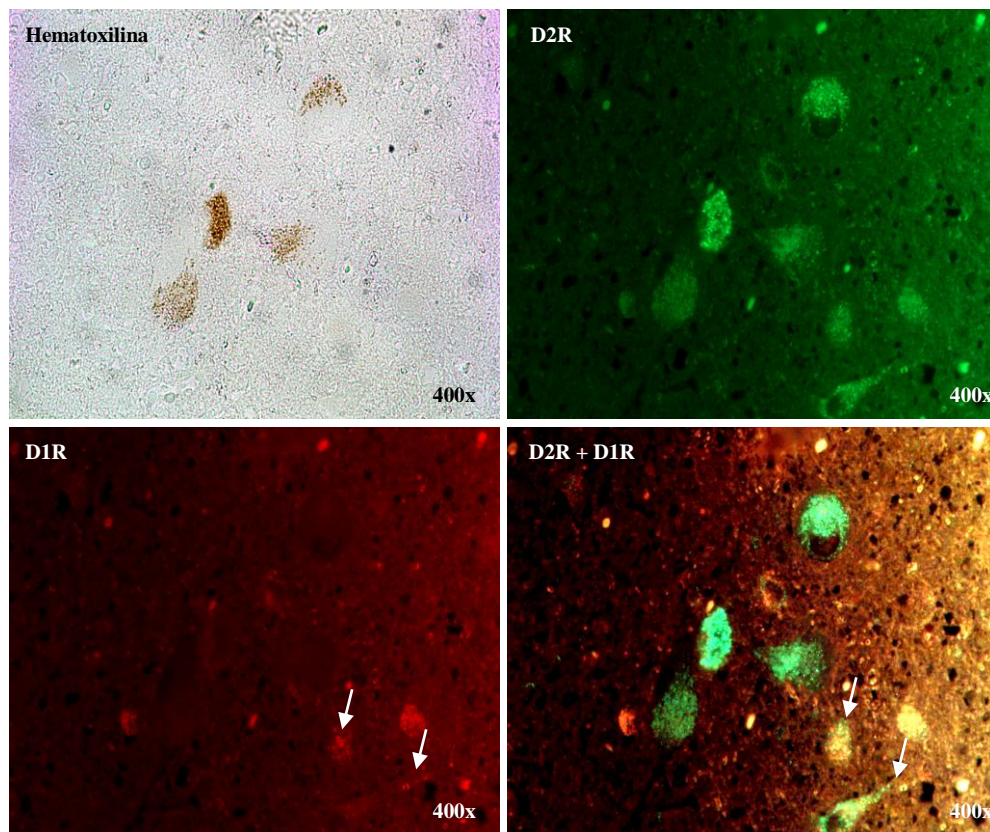
Analisando a distribuição ao longo da extensão crânio-caudal do núcleo com os dados da análise semiquantitativa confirma-se que os D2R estão presentes ao longo de todo o eixo crânio-caudal do LC, enquanto os D1R estão presentes de forma muito mais escassa. Verificou-se mais imunoreactividade para D2R na porção central do LC enquanto a imunoreactividade para D1R observou-se mais no terço superior do LC (fig. 15).



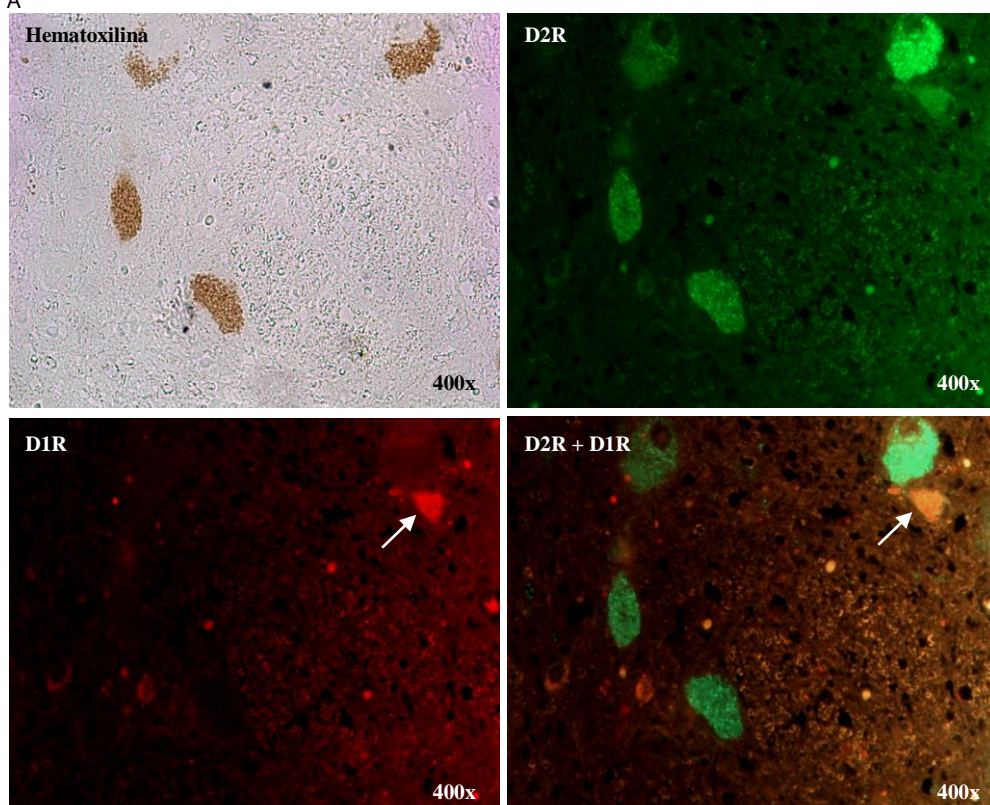
**Figura 15** – Representação gráfica da imunoreactividade quantificada para D2R e D1R em unidades arbitrárias de fluorescência, ao longo da extensão cranio-caudal do núcleo.

Relativamente à análise da co-localização dos neuroreceptores verifica-se que a maioria dos neurónios do LC expressa apenas um subtipo de neuroreceptor, no entanto alguns neurónios expressam ambos os subtipos (fig. 16 e 17).





16 A



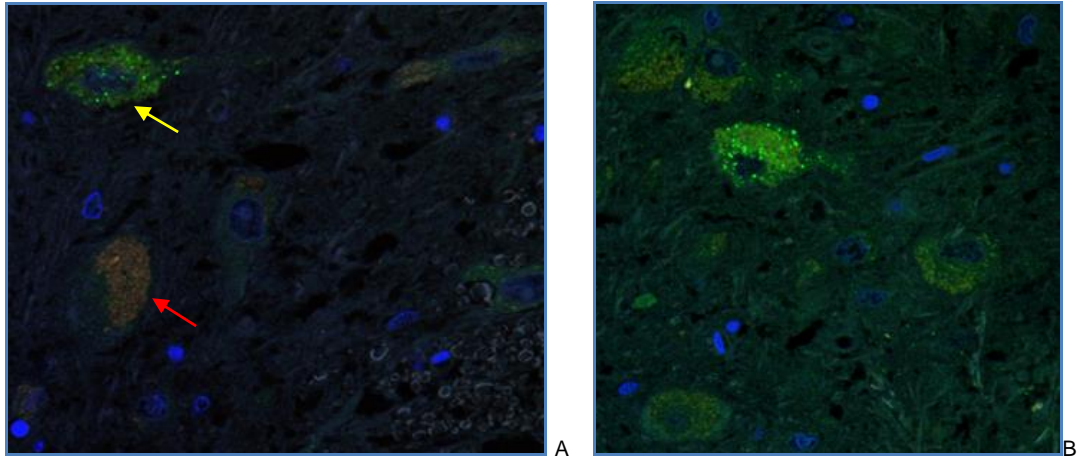
16 B

**Figura 16** – Análise da co-localização de D2R e D1R, através da sobreposição das imagens observadas ao microscópio de fluorescência, com o auxílio de um programa informático para processamento de imagens.

**16 A** – Verifica-se imunoreactividade para D2R na generalidade dos neurónios, observando-se neurónios que co-expressam D1R a nível do citoplasma e prolongamentos dendríticos (setas brancas).

**16 B** – Observa-se um neurónio que expressa apenas D1R.





**Figura 17** – Imagem de marcação imunohistoquímica com fluorescência para D2R e D1R ao microscópio confocal.  
**17 A** - Neurónios do LC que expressam apenas D2R (seta amarela) ou D1R (seta vermelha).  
**17 B** - Neurónios do LC que expressam apenas D2R.

## 5. DISCUSSÃO

A pertinência deste estudo surgiu na sequência do estudo previamente realizado [22] em que se concluiu que o LC humano é um núcleo mais longo do que previamente descrito. Tendo em conta que os circuitos neuroquímicos do LC em humanos estão ainda pouco estudados, avançou-se para o estudo do mapeamento de D1R e D2R no sentido de caracterizar a sua distribuição ao longo da extensão crânio-caudal do núcleo e a nível intracelular.

Um dos principais achados foi a predominância significativa de D2R comparativamente com D1R. Este achado é consistente com os resultados de estudos em roedores, que revelam maior expressão de mRNA dos D2R a nível do LC [45, 76] e evidenciam um papel preponderante dos D2R na promoção da vigília comparativamente com os D1R [60].

A análise semiquantificada da imunoreactividade aplicada neste estudo tem alguns vieses, que se relacionam com os seguintes fatores: os cortes histológicos analisados foram escolhidos em função da sua integridade histológica e histoquímica; a análise foi efetuada nas ampliações 200 – 400X, o que impossibilita a abrangência de toda a área axial do LC em cada plano; a imunoreactividade quantificada para cada um dos subtipos de neuroreceptor dopaminérgico é validada pelo observador. Neste contexto, a maior imunoreactividade global obtida para D2R ao nível da porção central do LC deve-se possivelmente ao fato de os neurónios se encontrarem mais concentrados nesta porção do núcleo [22].

A nível intracelular constatou-se uma distribuição predominante a nível citoplasmático para ambos os subtipos D2R e D1R, com pouca marcação a nível da membrana celular, verificando-se para o caso dos D2R uma marcação extensa a nível do citoplasma que se sobrepõe aos compartimentos contendo grânulos de neuromelanina.

Outros estudos já documentaram a localização predominantemente intracelular dos D2R [39, 58, 75]. Um estudo com marcação imunocitoquímica revelou que na ausência de estimulação dopaminérgica, os D2R localizam-se em amplos compartimentos citoplasmáticos que correspondem sobretudo ao retículo endoplasmático, com pouca contribuição do aparelho de Golgi ou de vesículas endossomáticas [58]. Estão descritas duas isoformas de D2R - a isoforma longa, D2Ra e a isoforma curta, D2Rb - que resultam de mecanismos de *splicing* alternativos do mRNA que alteram o tamanho da terceira *loop* citoplasmática do receptor. Os D2Rb localizam-se de forma difusa ao longo de toda a extensão do retículo endoplasmático, enquanto os D2Ra encontram-se concentrados na região perinuclear [58]. A retenção dos D2Ra no retículo endoplasmático induz a sua vacuolização, provavelmente induzida pela ativação da proteína G heterotrimérica ao qual estão acoplados, sendo plausível que os D2R desempenhem parte da sua função a nível intracelular [58]. Neste estudo, a razão para a fraca imunoreactividade verificada a nível da membrana celular não ficou completamente esclarecida; as etapas de fixação, permeabilização e incubação com o anticorpo *per se* não parecem ter influenciado, tendo-se colocado a hipótese da existência de um fator que prejudique o adequado acesso do anticorpo primário ao seu epitopo quando o receptor se localiza a nível membranar, tal como componentes da matriz extracelular [58].

O facto de se observar marcação também a nível dos grânulos de neuromelanina leva a crer que os receptores D2 localizam-se também a nível das membranas destes grânulos, nos neurónios do LC humano. Sabe-se que os grânulos de neuromelanina são organitos derivados da linha lisossómica que também contém algumas chaperonas moleculares derivadas do retículo endoplasmático, tais como a calnexina [73].

Relativamente aos D1R, dados de imunocitoquímica em neurónios do córtex frontal em humanos saudáveis revelam que estes se localizam a nível citoplasmático e da membrana celular [39]. Um outro estudo em neurónios do córtex pré-frontal de macacos revela que os D1R se localizam sobretudo a nível do retículo endoplasmático, seguido do aparelho de Golgi e em vesículas localizadas na porção proximal dos prolongamentos dendríticos, bem como na membrana plasmática da porção distal das dendrites [51].

No presente estudo fica por esclarecer a escassa marcação obtida a nível da membrana citoplasmática, podendo estar relacionada com fatores já evocados acima noutros estudos. Para o reconhecimento preciso dos compartimentos intracelulares em que se localizam D1R e D2R nos neurónios do LC seria necessária a observação dos cortes histológicos em microscopia eletrónica ou aplicação de corantes adequados para a identificação dos organitos intracelulares em que se verificou marcação.

## 6. CONCLUSÕES

Os subtipos D1R e D2R revelaram um padrão distinto de distribuição ao longo da extensão do LC humano e a nível intracelular.

Os D2R estão presentes na generalidade dos neurónios do LC, verificando-se uma marcação constante ao longo de todo o eixo cranio-caudal do núcleo, enquanto os D1R têm uma distribuição mais esparsa, verificada no terço superior do LC.

A nível intracelular, ambos os subtipos de receptores dopaminérgicos se expressam a nível do citoplasma, prolongamentos dendríticos e membrana celular, no entanto com franco predomínio a nível intracitoplasmático.

Os D2R localizam-se em amplas áreas do citoplasma, incluindo os compartimentos citoplasmáticos contendo grânulos de neuromelanina e nos prolongamentos dendríticos. Os D1R encontram-se sobretudo em células com pouco conteúdo de neuromelanina, localizando-se em compartimentos citoplasmáticos mais restritos e também nos prolongamentos dendríticos.

Habitualmente os neurónios expressam um só subtipo de neuroreceptor, sendo a co-localização de ambos os neuroreceptores menos frequentemente observada.

A análise semiquantitativa dos subtipos D2R/D1R confirmou que os D2R são significativamente mais abundantes ( $p \leq 0,004$ ) no LC humano.

## Bibliografia

---

- 1- Arya DK, Langley RW, Szabadi E, Bradshaw CM (1997) Comparison of the effects of high ambient temperature and clonidine on autonomic functions in man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* **355**, 376-383.
- 2- Aston-Jones G. (2005) Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep. Med.*; **6**(Suppl. 1):S3–S7.
- 3- Aston-Jones G, Bloom FE. (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* **1**:876–886.
- 4- Aston-Jones G, Chiang C, Alexinsky T. (1991) Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog. Brain Res.* **88**:501–520.
- 5- Aghajanian GK, VanderMaelen CP. (1982) Alpha 2-adreno-ceptor- mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies *in vivo*. *Science*. **15**:1394–1396.
- 6- Bay KD, Mamiya K, Good CH, Skinner RD, Garcia-Rill E. (2006) Alpha-2 adrenergic regulation of pedunclopontine nucleus neurons during development. *Neuroscience*. **141**:769–779.
- 7- Berridge CW, Foote SL. (1996) Enhancement of behavioural and electroencephalographic indices of waking following stimulation of noradrenergic  $\beta$ -receptors within the medial septal region of the basal forebrain. *J. Neurosci.*; **16**:6999–7009.
- 8- Berridge CW, Foote SL. (1991) Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J. Neurosci.*; **11**:3135–3145.
- 9- Bisette G, Klimek V, Pan J, Stockmeier C, Ordway G. (2003) Elevated concentrations of CRF in the Locus Coeruleus of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology*. **28**:1328-35.
- 10- Bourgin P, Huitrón-Reséndiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L. (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* **20**:7760–7765.
- 11- Brant-Zawadzki M, Norman D. (1985) Magnetic resonance imaging of the central nervous system. *West J Med.* Jan; **142**: 54–62.
- 12- Busch C, Bohl J, Ohm TG. (1997) Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobio Aging*, **18**, 401-406.
- 13- Bydder GM, Steiner RE. (1982) NMR image of the brain. *Neuroradiology* **23**:231-240
- 14- Charney DS, Grillon C, Bremner JD. (1998) The neurobiological basis of anxiety and fear: circuits, mechanisms, and neurochemical interactions (part 1). *Neuroscientist*. **4**:35–44.
- 15- Crochet S, Sakai K. (2003) Dopaminergic modulation of behavioural states in mesopontine tegmentum: A reverse microdialysis study in freely moving cats. *Sleep*. **26**:801–806.

- 16- Dahlström A, Fuxe K. (1964) Evidence for the existence of monoamine- containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **232**:1–55.
- 17- De Keyser J, Ebinger G, Vauquelin G. (1989) Evidence for a widespread dopaminergic innervation of the human cerebral neocortex. *Neurosci. Lett.* **104**, 281-285.
- 18- Deutch AY, Goldstein M, Roth RH. (1986) Activation of the locus coeruleus induced by selective stimulation of the ventral tegmental area. *Brain Res.* **363**, 307-314.
- 19- Dykes E, Afshar F. (1982) Computer generated three-dimensional reconstructions from serial sections. *Acta Stereo* **82**:289-296.
- 20- España RA, Berridge CW. (2006) Organisation of noradrenergic efferents to arousal-related basal forebrain structures. *J. Comp. Neurol* **496**:668–683.
- 21- Featherby T, Lawrence AJ. (2004) Chronic cold stress regulates ascending noradrenergic pathways. *Neuroscience* **127**, 949-960.
- 22- Fernandes P, Regala J, Correia F, Gonçalves-Ferreira AJ. (2012) The human locus coeruleus 3-D stereotactic anatomy; *Surg Radiol Anat* **34**:879–885
- 23- Foote SL, Berridge CW, Adams LM, Pineda JA. (1991) Electrophysiological evidence for the involvement of the locus coeruleus in alerting, orienting, and attending. *Prog. Brain Res.* **88**, 521-532.
- 24- Forstl, H., Levy, R., Burns, A., Luthert, P., Cairns, N. (1994) Disproportionate loss of noradrenergic and cholinergic neurons as cause of depression in Alzheimer's disease- a hypothesis. *Pharmacopsychiatry.* **27**, 11-15.
- 25- Garcia C, Schmitt P, D'Aleo P, Bittel J, Cure M, Pujol JF. (1994) Regional specificity of the long-term variation of tyrosine hydroxylase protein in rat catecholaminergic cell groups after chronic heat exposure. *J. Neurochem.* **62**, 1172-1181.
- 26- Gonçalves-Ferreira A. (1991) Stereotactic anatomy of the posterior cranial fossa – a study of the transcerebellar approach to the brainstem. *Acta Neurochir* **113**:149-165.
- 27- Gonçalves-Ferreira A. (2003) Stereotactic biopsy of focal brainstem lesions. *Surg Neurol* **60**:311-20
- 28- Guadilla Fernández ML (2009) Inhibidores de la recaptación de noradrenalina, in *Tratado de Psicofarmacología: Bases y aplicación clínica*. 2ª ed. Edited by Salazar M, Peralta C, Pastor FJ. Ed. Médica Panamericana. 611-616
- 29- Hajos M, Engberg G. (1990) A role of excitatory amino acids in the activation of locus coeruleus neurons following cutaneous thermal stimuli. *Brain Res.* **521**, 325-328.
- 30- Hakuno H, Oyamada Y, Murai M, Ito Y, Yamaguchi K. (2004) Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat. *Respir Physiol Neurobiol* Apr **20**;140:9-18.
- 31- Hou YP, Manns ID, Jones BE. (2002) Immunostaining of cholinergic pontomesencephalic neurons for alpha 1 versus alpha 2 adrenergic receptors suggests different sleep-wake state activities and roles. *Neuroscience*, **114**, 517-521.

- 32- Jones BE, Yang TZ. (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studies by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. Comp. Neurol.* **242**, 56-92.
- 33- Kaitin KI, Bliwise DL, Gleason C, Nino-Murcia G, Dement WC, Libet B. (1986) Sleep disturbance produced by electrical stimulation of the locus coeruleus in a human subject. *Biol. Psychiatry*.**21**:710–716.
- 34- Kall BA, Kelly PJ, Goerss S, Frieder G. (1985) Methodology and clinical experience with computed tomography and a computer-resident stereotactic atlas. *Neurosurgery* 17(3)400-407
- 35- Keren IN, Lozar CT, Harris KC, Morgan PS, Eckert MA (2009) In vivo mapping of the human locus coeruleus. *Neuroimage* 47:1261–1267
- 36- Kim M-A, Lee HS, Lee BY, Waterhouse BD. (2004) Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.*;**1026**:56–67.
- 37- Kiyashchenko LI, Mileykovskiy BY, Lai Y-Y, Siegel JM. (2001) Increased and decreased muscle tone with orexin (hypocretin) microinjections in the locus coeruleus and pontine inhibitory area. *J. Neurophysiol.***85**:2008–2016
- 38- Krahl SE, Clark KB, Smith DC, Browning RA. (2005) Locus Coeruleus Lesions Suppress the Seizure-Attenuating Effects of Vagus Nerve Stimulation. *Epilepsia*. 39:709-14.
- 39- Kumar U, Patel SC. (2007) Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer disease brain; *Brain Research* 1131: 187-196
- 40- Lee HS, Lee BY, Waterhouse BD. (2005) Retrograde study of projections from the tuberomammillary nucleus to the dorsal raphe and the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.*;**1043**:65–75.
- 41- Leung, N.K., Bradshaw, C.M., Szabadi, E. (1992) Effect of high ambient temperature on the kinetics of the pupillary light reflex in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol* **33**, 458-460.
- 42- Liddell BJ, Brown KJ, Kemp AH, Barton MJ, Das P, Peduto A, Gordon E, Williams LM. (2005) A direct brainstem amygdala-cortical “alarm” system for subliminal signals of fear. *NeuroImage* **24**, 235-243.
- 43- Lu J, Zhou TC, Saper CB. (2006) Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J. Neurosci.***26**:193–202.
- 44- Maeda T, Kitahama K, Geffard M. (1994) Dopaminergic innervations of locus coeruleus: A light and electron microscopic immunohistochemical study. *Microsc Res Tech.* Oct 15;**29**:211-8.
- 45- Mansour A, Watson SJ. (1995) Dopamine receptor expression in the Central Nervous System. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press. 207–19.
- 46- Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC. (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res. Rev.*;**45**:38–78.

- 47- McRae-Degueurce A, Milon H. (1983) Serotonin and dopamine afferents to the rat locus coeruleus: a biochemical study after lesioning of the ventral mesencephalic tegmental-A10 region and the raphe dorsalis. *Brain Res* **263**, 344-347.
- 48- McGregor R, Siegel JM. (2010) Illuminating the locus coeruleus: control of posture and arousal; *Nature Neuroscience* **Volume: 13**, Pag:1448-9.
- 49- Mehler MF, Purpura DP. (2009) Autism, fever, epigenetics and the locus coeruleus. *Brain Res Rev* 59: 388–392.
- 50- Minzenberg MJ, Watrous AJ, Yoon JH, Ursu S, Carter CS. (2008) Modafinil Shifts Human Locus Coeruleus to Low-Tonic, High-Phasic Activity During Functional MRI; *Science* 12 Dec: 322:1700-1702
- 51- Muly EC, Szigeti K, Goldman-Rakic PS. (1998) D1 Receptor in Interneurons of Macaque Prefrontal Cortex: Distribution and Subcellular Localization. *J Neurosci.* Dec 15;18:10553-65.
- 52- Nahas Z., Marangell LB, Husain MM, Rush AJ, Sackeim HA, Lisanby SH, Martinez JM, George MS (2005) Two year outcome of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment of major depressive episodes. *J. Clin. Psychiatry*, **66**, 1097-1104.
- 53- Nitz D, Siegel JM. (1997) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* **78**:795–801.
- 54- Nicolas Singewald. (1998) Release of neurotransmitters in the locus coeruleus; *Progress in Neurobiology* 237-267.
- 55- Olszewski J, Baxter D (1982) Cytoarchitecture of the human brainstem. 2nd ed, Barger, Basel.
- 56- Ornstein K, Milon H, McRae-Degueurce A, et al. (1987) Biochemical and radioautographic evidence for dopaminergic afferents of the locus coeruleus originating in the ventral tegmental area. *J Neural Transm* 70:183–91.
- 57- Parvizi J, Damasio AR. Neurochemical correlates of brainstem coma. *Brain.* 2003;**126**:1524–1536.
- 58- Prou D, Gu WJ, Le Crom S, Vincent JD, Salamero J, Vernier P. (2001) Intracellular retention of the two isoforms of the D2 dopamine receptor promotes endoplasmic reticulum disruption. *J Cell Sci.* 114:3517-27.
- 59- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall W, LaManthia A-S, McNamara JO, White LE. (2008) *Neuroscience*. 4th ed. Sinauer. pp 248-249.
- 60- Qu WM, Huang ZL, Xu XH, Matsumoto N, Urade Y. (2008) Dopaminergic D1 and D2 Receptors Are Essential for the Arousal Effect of Modafinil. *J Neurosci.* 20;28(34):8462-9.
- 61- Qu WM, Xu XH, Yan MM, Wang YQ, Urade Y, Huang ZL. (2010) Essential Role of Dopamine D2 Receptor in the Maintenance of Wakefulness, But Not in Homeostatic Regulation of Sleep, in Mice. *J Neurosci.* Mar 24;30:4382-9.
- 62- Rajkowski J, Kubiak P, Aston-Jones G. (1994) Locus coeruleus activity in monkey: phasic and tonic changes are associated with altered vigilance. *Brain Res. Bull.* **35**:607-616.



- 63- Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D. (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*.**128**:1314–1322.
- 64– Roux JC, Panayotis N, Dura E, Villard L. (2010) Progressive Noradrenergic Deficits in the Locus Coeruleus of Mecp2 Deficient Mice. *J Neurosci Res*. 88:1500-9.
- 65- Sakurai T. (2005) Roles of Orexin/Hypocretin in Regulation of Sleep/Wakefulness and Energy Homeostasis; *Sleep Med Rev* 9:231-241.
- 66- Samuels ER, Hou RH, Langley RW, Szabadi E, Bradshaw CM. (2006) Comparison of pramipexole and modafinil on arousal, autonomic, and endocrine functions in healthy volunteers. *J. Psychopharmacol*.**20**, 756-770.
- 67- Samuels E R, Szabadi E. (2008) Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part I: Principles of Functional Organisation; *Curr Neuropharmacol*. 6: 254–285.
- 68- Samuels ER, Szabadi E. (2008) Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part II: Physiological and Pharmacological Manipulations and Pathological Alterations of Locus Coeruleus Activity in Humans; *Curr Neuropharmacol*. 6: 254–285.
- 69- Simon H, Le Moal M, Stinus L, et al. (1979) Anatomical relationships between the ventral mesencephalic tegmentum A10 region and the locus coeruleus as demonstrated by anterograde and retrograde tracing techniques. *J Neural Transm*;44:77–86.
- 70- Srinivasan J, Schmidt WJ. (2004) Behavioral and neurochemical effects of noradrenergic depletions with N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2- bromobenzylamine in 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res*.**151**:191–199.
- 71- Srinivasan J, Schmidt WJ. (2003) Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine- induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur. J. Neurosci*. **17**:2586–2592.
- 72- Steininger TL, Gong H, McGinty D, Szymusiak R. (2001) Subregional organization of preoptic area/anterior hypothalamic projections to arousal- related monoaminergic cell groups. *J. Comp. Neurol* **429**:638–653.
- 73- Tribl F, Gerlach M, Marcus K, Asan E, Tatschner T, Arzberger T, Meyer HE, Bringmann G, Riederer P. (2005)"Subcellular proteomics" of neuromelanin granules isolated from the human brain. *Mol Cell Proteomics* 4:945-57.
- 74- Verret L, Fort P, Gervasoni D, Léger L, Luppi P-H. (2006) Localization of the neurons active during paradoxical (REM) sleep and projecting to the locus coeruleus noradrenergic neurons in the rat. *J. Comp. Neurol*. **495**:573–586.
- 75- Voulalas PJ, Schetz J, Undieh AS. (2011) Differential subcellular distribution of rat brain dopamine receptors and subtype-specific redistribution induced by cocaine; *Mol Cell Neurosci*. 46:645-54.
- 76– Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR. (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:1859-63.

77- Wu MF, Gulyani SA, Yau E, Mignot E, Phan B, Siegel JM. (1999) Locus Coeruleus neurons: cessation of activity during cataplexy. *Neuroscience* 91:1389-99.

78 - [www.scbt.com/datasheet-5303-d2dr-b-10-antibody.html](http://www.scbt.com/datasheet-5303-d2dr-b-10-antibody.html)

79 - [www.scbt.com/datasheet-14001-d1dr-h-109-antibody.html](http://www.scbt.com/datasheet-14001-d1dr-h-109-antibody.html)

80 - Xavier-Morato MJ (1981) *Anatomia microscópica do sistema nervoso central*, 3ªed. Livraria Sá da Costa, Lisboa

81 - Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC. (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol* **60**:337–341.

## Agradecimentos

---

***“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está a ver e pensar de uma forma diferente”.***

*Roger Von Oech*

***“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, - é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda”***

*Antoine de Saint-Exupéry*

Desde os primeiros anos da faculdade que a área das Neurociências me fascina, começando na disciplina de Neuroanatomia, na qual exerci funções de monitora, e nos estágios de investigação laboratorial que integrei enquanto aluna. Terminado o curso tive a oportunidade de continuar a lecionar a disciplina de Neuroanatomia como Assistente Convidada e de dar continuidade aos projetos de investigação como tutora dos mesmos, sob a orientação do Professor Doutor Gonçalves Ferreira. Perguntava-me até onde chegaria, e o projeto que integrei foi-me cativando de forma subtil, cada vez mais, apesar de algumas inquietações inerentes a qualquer investigação. Por vezes quando navegava na adversidade e parecia chegar ao limite de não conseguir avançar, empreendia novo caminho, sempre que alumia alguma ideia, procurando encher o meu espírito de claridade. Aos poucos fui-me envolvendo neste projeto que foi fluindo, deixando-me invadir por aquela grata sensação de tentar perceber o impenetrável como um segredo e que veio a tornar-se a minha Dissertação de Mestrado.

A concretização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de manifestar o meu profundo agradecimento e reconhecimento, em particular:

Ao *Professor Doutor António Gonçalves Ferreira*, pela permanente disponibilidade, pela incansável orientação científica, pelas opiniões e críticas, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que foram decisivos para a elaboração desta investigação.

Ao *Professor Doutor Ivo Furtado*, pela amabilidade e pelas constantes palavras de incentivo, ao longo da realização desta dissertação.

Às colegas, *Mestre Lia Neto e Dra. Paula Fernandes*, pela amizade, companheirismo, estímulo, espírito de entreatajuda e por todos os momentos de trabalho conjunto.

Ao *Instituto de Medicina Legal de Lisboa*, pela disponibilização do material anatómico utilizado no estudo.

Ao *Engenheiro José Rino*, pelo apoio prestado na utilização do programa informático utilizado no estudo morfológico do LC.

Ao *Dr. Francisco Correia* e ao *Dr. Pedro Henriques* pela prestimosa colaboração na execução do trabalho técnico de laboratório.

Ao *Dr. Pedro Pereira* pela incansável disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e no solucionar de problemas que foram surgindo ao longo da realização desta investigação, nomeadamente no âmbito da marcação imunohistoquímica e do estudo quantitativo.

Aos alunos *Diogo Andrade*, *André Barata*, *Inês Mendes* e *Miguel Martins*, pelo interesse e colaboração nas tarefas de laboratório.

A todo o pessoal do Instituto de Anatomia Normal da Faculdade de Medicina de Lisboa, em particular à *D. Conceição Franco*, à *D. Ema Gaitero*, à *D. Isabel Pedrinho*, à *D. Maria José Pereira* e à *D. Isabel Campos* pela simpatia, amizade e boa disposição.

A todos os meus *Amigos*, em especial, à *Linda Couto*, pelas palavras de amizade e pela transmissão de confiança e de força em todos os momentos.

À minha *Família*, pelo apoio incondicional, compreensão nos momentos de maior indisponibilidade minha e por todos os ensinamentos de vida. Ao meu *Avô Paterno*, já falecido, uma dedicatória especial, pelas constantes manifestações de interesse pelo meu percurso académico, incentivando-me constantemente perante todos os desafios.